

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DEBORA REGINA DOS SANTOS

USO DE BIOMARCADORES NA AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE PEIXES À  
POLUIÇÃO AQUÁTICA NOS RESERVATÓRIOS DO IRAÍ E PASSAÚNA

CURITIBA  
2013

DEBORA REGINA DOS SANTOS

USO DE BIOMARCADORES NA AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE PEIXES À  
POLUIÇÃO AQUÁTICA NOS RESERVATÓRIOS DO IRAÍ E PASSAÚNA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

CURITIBA  
2013

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente neste trabalho, especialmente ao professor Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, pela orientação; aos professores Dr. Marco Ferreira Randi e Dr. Francisco Filipak Neto por me auxiliarem durante o desenvolvimento do trabalho; aos meus colegas de laboratório pela colaboração e apoio; ao meu namorado Paulo e minha mãe pelo suporte e paciência nos momentos de estresse; e por fim ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro.

## RESUMO

O rápido crescimento demográfico, aliado ao desenvolvimento urbano, industrial e agrícola, tem intensificado cada vez mais a degradação dos ecossistemas aquáticos, reduzindo desta maneira a qualidade e disponibilidade de fontes de água limpa em todo o planeta. Fundamentado no contexto de diagnóstico e monitoramento ambiental de ecossistemas aquáticos contaminados, o presente trabalho buscou avaliar efeitos da poluição aquática através de biomarcadores de citotoxicidade analisados em peixes de dois reservatórios de abastecimento público da região metropolitana de Curitiba, os reservatórios do Iraí e Passaúna, os quais foram avaliados pelo Instituto Ambiental do Paraná – IAP como criticamente e moderadamente degradados respectivamente. Para tal propósito, foram realizados dois tipos de abordagens, uma de avaliação crônica onde foram coletadas diferentes espécies de peixes residentes no reservatório do Iraí, visando avaliar diferenças interespecíficas de sensibilidade à poluição, e outra de avaliação sub-crônica no qual foi realizado um experimento de exposição *in situ* nos reservatórios do Iraí e Passaúna, onde alguns peixes foram mantidos em tanques-redes durante seis meses e coletados ao final deste período para comparação das respostas desenvolvidas em cada reservatório. Durante as coletas, foram obtidos diferentes tecidos com os quais foram realizadas análises de biomarcadores bioquímicos e morfológicos de contaminação ambiental. Os resultados obtidos mostraram que o Passaúna, oficialmente classificado como moderadamente degradado, mostrou-se com potencial tão tóxico quanto o Iraí, classificado como criticamente impactado, o destaca a importância do biomonitoramento como ferramenta no diagnósticos da qualidade da água em reservatórios de abastecimento público. Além disto, o presente trabalho também mostra que a sensibilidade à poluição aquática em peixes varia não somente em relação a espécie, mas também em relação ao órgão analisado e a via principal de exposição, mostrando que a escolha dos bioindicadores e biomarcadores utilizados em programas de biomonitoramento deve ser cuidadosa para se evitar subestimativas e confusões de análise. Abre-se, portanto, uma discussão quanto aos métodos de análise da qualidade de água em reservatórios, sugerindo novos estudos que viabilizem o planejamento de melhores programas de monitoramento ambiental associados a estratégias eficientes de conservação e manejo destes ecossistemas.

Palavras-chave: reservatórios de abastecimento, poluição química, biomarcadores, biomonitoramento, Curitiba (PR) – Região Metropolitana.



## ABSTRACT

In the last decades the degradation of the aquatic ecosystems has been intensified, causing the reduction of water quality and availability of clean water sources all over the world. It stands out the fundamental importance of the knowledge about the potential toxicity of complex chemical mixtures present in polluted environments, which could help to improving diagnostic techniques for environmental monitoring. In this context, the goal of the current study was to evaluate the effects of aquatic pollution through cytotoxicity biomarkers in fishes of two water reservoirs located in the surrounding region of Curitiba: the Iraí reservoir and the Passaúna reservoir, which were appraised by the Paraná's Environment Institute (Instituto Ambiental do Paraná-IAP) as critically and moderately degraded respectively. Two kinds of experiments were accomplished, one of chronic evaluation in which different species of fishes were collected in the Iraí reservoir for evaluation of differences of sensitivity between species, and another of sub-chronicle evaluation in which an experiment of exposure *in situ* was accomplished in the Iraí and Passaúna reservoirs, where the fishes were caged during six months in the reservoir, and then they were captured for comparing the biological responses developed in each reservoir. Biochemical and morphological biomarkers were measured in brain, gills, muscles, livers and gonads for all the fishes captured. The obtained results showed that the biomonitoring is a fundamental tool in the diagnosis of water quality in reservoirs of public provisioning, since Passaúna reservoir which were appraised as just moderately degraded was so poisonous to the fishes as the Iraí reservoir, classified as critically degraded. Besides, the present work also displays that one needs to be careful when choosing the bioindicators and biomarkers in biomonitoring programs, because the sensitivity to the aquatic pollution in fishes varies not only between species, but also between different biomarkers in a same specie according to the main route of exposure and the natural tissue characteristics. Therefore, there is an open discussion on methods of water quality analysis in reservoirs, which suggests that new studies can make possible the planning of complete environmental monitoring programs associated to efficient strategies of conservation and handling of these ecosystems.

Key-words: Biomarkers, biomonitoring, aquatic pollution, water reservoirs.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I

FIGURA 1:Localização dos Reservatórios do Iraí e do Passaúna .....	16
FIGURA 2: Variação no Índice de Qualidade de Água de Reservatórios (IQAR) avaliado pelo IAP entre 1999 e 2008, Reservatório do Iraí .....	17
FIGURA 3: Variação no Índice de Qualidade de Água de Reservatórios (IQAR) avaliado pelo IAP entre 1999 e 2008, Reservatório do Passaúna.....	17
FIGURA 4: <i>Oreochromis niloticus</i> .....	18
FIGURA 5:Avaliação histopatológica do fígado após exposição nos reservatórios de Iraí e Passaúna.....	28
FIGURA 6: Microscopia de luz de fígado.....	29
FIGURA 7: Corte histológico de gônada de <i>O. niloticus</i> . ....	31
FIGURA 8: Corte histológico da gônada <i>O. niloticus</i> do reservatório do Iraí .....	31
FIGURA 9: Corte histológico da gônada <i>O. niloticus</i> do reservatório do Passaúna.....	32
FIGURA 10: Histopatologia de Brânquias grupo TR-Passaúna. ....	33
FIGURA 11: Histopatologia de Brânquias grupo TR-Iraí.....	34

### Capítulo II

FIGURA 1: Exemplos de espécies pertencentes aos grupos popularmente conhecidos como lambaris, tilápias e traíras. ....	45
FIGURA 2:Histopatologia de Brânquias de <i>Hoplias malabaricus</i> capturadas no reservatório do Iraí. ....	50
FIGURA 3: Histopatologia de Brânquias de <i>Tilapia rendalli</i> capturados no reservatório do Iraí.....	51
FIGURA 4: Histopatologia de brânquias de <i>Astyanax sp.</i> capturados no reservatório do Iraí.....	52
FIGURA 5:Valores médios do índice de alterações histopatológicas (Índice de Bernet) do fígado nas três espécies expostas cronicamente no reservatório do Iraí e seus respectivos grupos de referencia .....	54
FIGURA 6:Corte histológico de fígado - grupo <i>Astyanax sp</i> Iraí.....	55
FIGURA 7: Corte histológico de fígado - grupo <i>H. malabaricus</i> Iraí .....	56
FIGURA 8: Corte histológico de fígado - Grupo <i>H. malabaricus</i> Iraí.....	57
FIGURA 9:Corte histológico de fígado - Grupo <i>Tilapia rendalli</i> Iraí. ....	58
FIGURA 10:Corte histológico das gônadas dos animais coletados no reservatório do Iraí. .	60
FIGURA 11:Análises bioquímicas realizadas em cérebro e músculo dos animais avaliados.....	62
FIGURA 12:Análises bioquímicas realizadas no fígado dos animais avaliados.....	63

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

TABELA 1: Fator de importância das alterações consideradas na análise histopatológica de acordo com Bernet et al. (1999).....	22
TABELA 2: Informações sobre peso, comprimento e fator de condição.....	27
TABELA 3: Avaliação comparativa da ocorrência de alterações nos cortes histológicos de fígado em <i>O niloticus</i> de ambos os reservatórios avaliados.....	28
TABELA 4: Frequências relativas de alterações encontradas nas brânquias de cada grupo.....	33
TABELA 5: Análises bioquímicas realizadas com <i>O. niloticus</i> mantidas em tanques-redes nos dois reservatórios.....	35

### Capítulo II

TABELA 1: Número de indivíduos coletados no reservatório do Iraí .....	48
TABELA 2: Frequências relativas do número de indivíduos que apresentaram lesões histopatológicas nas brânquias.....	49
TABELA 3: Ocorrência de lesões no fígado dos grupos coletados no reservatório do Iraí ....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS

AChE – Acetilcolinesterase  
AI – Grupo *Astyanax* sp. – Iraí  
ARF – Grupos *Astyanax* sp. – Referência  
CMMs – Centro de melanomacrófagos  
EROs – Espécies reativas de oxigênio  
GSH – Glutathione reduzida  
GST – Glutathione-S-transferase  
HI – Grupo *Hoplias malabaricus* – Iraí  
HRF – Grupo *Hoplias malabaricus* – Referência  
IAP – Instituto ambiental do Paraná  
LPO – Peroxidação lipídica  
PCO – Carbonilação protéica  
TR-Iraí, TR-Passaúna – Tanque-Rede Iraí e tanque-rede passaúna  
TI – Grupo *T. rendalli* – Iraí  
TRF – Grupo *Tilapia* – Referência (*Oreochromis niloticus*)

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>7</b>
1.1. A Contaminação Aquática.....	7
1.2. Bioindicadores e Biomarcadores de Poluição hídrica .....	9
1.2.1 Biomarcadores Somáticos.....	9
1.2.2 Histopatologia como Biomarcador .....	10
1.2.3 Biomarcador Neurotóxico – Acetilcolinesterase .....	11
1.2.4 Estado Óxido-Redutor como Biomarcador .....	11
 <b>CAPÍTULO I - AVALIAÇÃO <i>IN SITU</i> DA QUALIDADE DA ÁGUA DOS RESERVATÓRIOS DO IRAÍ E PASSAÚNA – REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA, ATRAVÉS DE BIOMARCADORES EM <i>Oreochromius niloticus</i>.....</b>	<b>14</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1 Os Reservatórios de Abastecimento Urbanos .....	15
1.2 O Modelo Biológico.....	18
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS - DESENHO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>20</b>
3.1 Fator de Condição .....	20
3.2 Histopatologia de Fígado e Gônadas.....	21
3.3 Histopatologia de Brânquias .....	22
3.4 Biomarcadores bioquímicos.....	22
3.4.1 Acetilcolinesterase em Músculo e Cérebro.....	23
3.4.2 Concentração de Tióis Não-Protéicos (GSH e outros tióis) .....	23
3.4.3 Peroxidação lipídica (LPO).....	24
3.4.4 Carbonilação Proteica .....	24
3.4.5 Atividade da Glutathione S-transferase.....	25
3.4.6 Atividade da Catalase .....	26
3.5 Análise Estatística.....	26
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
4.1 Histopatologia do fígado e gonadas.....	27
4.2 Arquitetura das Brânquias.....	32
4.3 Análises bioquímicas – cérebro, músculo e fígado.....	35
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>44</b>
 <b>CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DA SAÚDE DA ICTIOFAUNA NO ESTUDO DA QUALIDADE DA ÁGUA DO RESERVATÓRIO DOIRAÍ - REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA...</b>	<b>45</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>46</b>
1.1. Bioindicadores Utilizados .....	46
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>50</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>52</b>
4.1. Ultraestrutura das Brânquias .....	52
4.2. Histologia de Fígado e Gônadas .....	57
4.3. Análises bioquímicas – Cérebro e Músculo .....	65
4.4. Análises Bioquímicas – Fígado .....	66
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>68</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>79</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>82</b>

## **1. INTRODUÇÃO GERAL**

A demanda pelo abastecimento de água tem aumentado rapidamente em todo o planeta, principalmente diante do crescimento demográfico acentuado e do desenvolvimento urbano, industrial e agrícola. Por outro lado, a atividade antrópica desordenada tem comprometido cada vez mais os recursos hídricos disponíveis, degradando os ecossistemas aquáticos e atingindo diretamente a sociedade com a redução da qualidade e disponibilidade de fontes de água limpa. Diante deste panorama, é crescente a preocupação com a manutenção sustentável da água, um recurso renovável porém limitado, e com o desenvolvimento de instrumentos de diagnóstico e proteção, que possam adequar o planejamento urbano de acordo com a capacidade natural do sistema hídrico.

Destaca-se assim a importância fundamental das investigações sobre os efeitos tóxicos de misturas químicas complexas nos ecossistemas expostos em ambientes poluídos. Baseado neste contexto, o presente trabalho buscou avaliar a qualidade da água em reservatórios de abastecimento público da região metropolitana de Curitiba utilizando biomarcadores em diferentes espécies de peixes. Este trabalho foi dividido em duas partes, uma de avaliação sub-crônica e uma de avaliação crônica: na primeira foi realizado um estudo comparativo de biomarcadores em peixes mantidos em tanques-redes em dois reservatórios, enquanto na segunda foram capturadas três espécies de peixes residentes no reservatório do Iraí para comparação das respostas entre as espécies. Uma breve revisão de conceitos ligados a ambas as partes deste trabalho é apresentada na sequência.

### **1.1. A CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA**

O Brasil dispõe de uma considerável riqueza de recursos hídricos detendo quase 15% das reservas hídricas de todo o Planeta. Entretanto, o uso irracional da água já representa um motivo de urgência em muitos distritos brasileiros, pois grande parte dos rios e mananciais encontram-se poluídos, incluindo aqueles utilizados para abastecimento público. Isso pode representar um sério problema à população, pois, de modo geral no país, as áreas mais densamente urbanizadas são as que apresentam menor potencial hídrico e maior grau de contaminação (ATLAS

BRASIL, 2010). A bacia do Alto Iguaçu, por exemplo, que compreende o complexo hídrico situado na Região Metropolitana de Curitiba (região mais urbanizada do Paraná), apresenta níveis consideráveis de contaminação em grande parte de suas águas, com avaliações técnicas variando principalmente entre moderadamente poluídos até extremamente poluídos, com altos teores de coliformes fecais, matéria orgânica, bactérias transmissoras de endemias, cianobactérias, metais (cromo, chumbo, mercúrio, cobre e níquel), fenóis, surfactantes, além de vários outros contaminantes que tornam alguns rios incapazes de suportar vida aquática superior e podem ainda influenciar diretamente na qualidade das águas de captação (IAP, 2009a).

O enriquecimento de nutrientes nos ecossistemas aquáticos, especialmente aqueles que contêm fósforo e nitrogênio, é um importante fator de eutrofização e crescimento acelerado de algas, as quais produzem diversas toxinas nocivas que podem provocar sérias intoxicações nos organismos que as ingerem (CLEMENTE *et al.*, 2010). Além disto, vários outros contaminantes existentes em águas poluídas como o dicloro-difenil-tricloro-etano (DDT), pesticidas organoclorados (PCOs), toxofeno, polibifenis clorados (PCBs), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), metais tóxicos e um grande número de outros contaminantes, geram sérios riscos à saúde dos organismos que estão expostos direta ou indiretamente a estas águas (VALAVANIDIS *et al.*, 2006). Muitos destes poluentes estimulam uma variedade de mecanismos tóxicos, interferindo no sistema antioxidante celular, a atividade neural, a fisiologia reprodutiva e o comportamento animal, podendo até mesmo provocar neoplasias ou a morte de um organismo exposto à altos níveis de poluentes (VALAVANIDIS *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2011; WESTER *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2005). Ainda que presentes em baixas concentrações na água, vários destes xenobióticos podem passar por fenômenos de bioacumulação e biomagnificação ao longo da cadeia alimentar, aumentando assim a concentração destas toxinas nos níveis mais altos das cadeias tróficas (DEFOREST *et al.*, 2007).

Deste modo, tem crescido cada vez mais a preocupação pelo diagnóstico precoce de contaminação ambiental, onde um planejamento de controle ambiental poderia vir antes do problema atingir grandes proporções. Uma maneira já bastante discutida de realizar este diagnóstico precoce é o biomonitoramento, no qual organismos são utilizados como indicadores da qualidade ambiental através de mudanças em suas respostas fisiológicas, como será discutido na próxima seção.

## **1.2. BIOINDICADORES E BIOMARCADORES DE POLUIÇÃO HÍDRICA**

Bioindicadores são definidos como espécies animais ou vegetais que podem indicar os primeiros sinais de estresse ambiental causado por contaminantes (ADAMS, 2002). Uma possível forma de análise destes bioindicadores é a utilização de biomarcadores, que são respostas biológicas alteradas, passíveis de mensuração, que podem ser relacionadas à exposição e efeitos tóxicos de substâncias químicas (VAN DER OOST, BEYER, VERMEULEN 2003). Os biomarcadores podem ser identificados nos níveis bioquímico, celular, individual, populacional, de comunidade ou de ecossistema, porém, os efeitos iniciais dos poluentes são mais impactantes nos níveis organizacionais mais básicos, como respostas bioquímicas e moleculares. Deste modo, tais respostas podem ser utilizadas como biomarcadores precoces de contaminação, pois podem responder se a contaminação ambiental, ainda que em baixo grau, é suficiente para causar efeitos fisiológicos e, em casos positivos, justificar investigações adicionais para determinar a natureza e o grau de contaminação. A vantagem do monitoramento neste estágio é que as alterações ambientais provocadas pela poluição ainda podem ser reversíveis e o comprometimento mais severo do ambiente pode ser prevenido (VAN DER OOST, BEYER, VERMEULEN 2003).

Em estudos de contaminação aquática, diferentes espécies de peixes têm sido utilizadas como bioindicadores, utilizando-se a análise de muitos biomarcadores de exposição e efeito que incluem parâmetros bioquímicos, morfológicos, imunológicos e genéticos (VAN DER OOST, BEYER, VERMEULEN 2003). A seguir serão brevemente apresentados os biomarcadores escolhidos para a realização deste trabalho.

### **1.2.1 Biomarcadores somáticos**

A relação peso-comprimento corporal é uma importante ferramenta para o estudo da condição de saúde e produção de biomassa de uma população, pois ela reflete as interações entre o animal e os fatores bióticos e abióticos de seu ambiente, podendo indicar o quanto as alterações ambientais ocorridas num dado

ecossistema são capazes de interferir no desenvolvimento dos animais (CAMARA, CARAMASCHI E PETRI, 2011). Os índices corporais, também conhecidos como fator de condição (K), mais comumente utilizados são o de Fulton, o índice alométrico e o índice relativo. O primeiro é baseado em uma relação isométrica entre o peso (W) e o comprimento (L), dada pela expressão  $W = \alpha L^3$ , onde  $\alpha$  é o coeficiente linear e 3 é o coeficiente angular da relação. Diferentemente desse, o índice alométrico leva em consideração um coeficiente angular variável da relação entre W e L ( $W = \alpha L^b$ ), o qual depende de fatores inter e intraespecíficos, ambientais, sazonais, ontogenéticos, ou ainda relacionados a maturidade sexual dos indivíduos. O índice relativo, por sua vez, expressa uma relação entre o peso observado W e um peso médio esperado W' ( $K_r = W.W'^{-1}$ ), o qual é estimado com base na expressão  $W = \alpha L^3$  (FROESE, 2006).

### 1.2.2 Histopatologia como Biomarcador

As análises histopatológicas têm sido reconhecidas como ferramentas muito úteis no estudo de efeitos agudos e crônicos de poluentes em peixes, uma vez que as características histológicas de órgãos-alvo podem expressar diversas alterações decorrentes de condições ambientais adversas e períodos de exposição prolongados, revelando assim órgãos mais afetados e diferenças de sensibilidade dos organismos em relação aos níveis tóxicos de contaminantes (AKAISHI *et al.*, 2004; OLIVEIRA-RIBEIRO *et al.*, 2002, 2005; WESTER E CANTON, 1991).

Neste trabalho, foram escolhidos três órgãos para a investigação histopatológica como biomarcador de alterações ambientais: fígado, gônadas e brânquias. O fígado foi escolhido por ser o órgão mais comumente envolvido na detoxificação de xenobióticos (VAN DER OOST, BEYER, VERMEULEN 2003). A escolha das gônadas deveu-se ao fato de diversos poluentes orgânicos, em sua maioria de origem antropogênica, atuarem como desreguladores endócrinos capazes de inibir ou mimetizar a função de um hormônio natural nos seres vivos, alterando as funções e morfologia do sistema endócrino (JOHNSON *et al.*, 1993). E por fim, o tecido branquial foi escolhido por estar em contato direto com a água do meio e por ser ricamente vascularizado, o que o torna extremamente vulnerável à danos causados por fatores externos como os xenobióticos, sendo sensível o bastante para indicar efeitos iniciais de baixas concentrações de químicos em organismos (PAWERT, MULLER, TRIEBSKORN 1998).



### 1.2.3 Biomarcador Neurotóxico – Acetilcolinesterase

As atividades neurológicas e comportamentais de animais também podem ser extremamente sensíveis a contaminação ambiental, o que faz do sistema nervoso uma importante fonte de respostas biomarcadoras (FLAMMARION e GARRIC, 2002). Um biomarcador bastante conhecido no diagnóstico de efeitos neurotóxicos de xenobióticos é a atividade da enzima acetil-colinesterase (AChE). A AChE cataliza a hidrólise do neurotransmissor acetil-colina (ACh) restante no espaço sináptico em colina e acetato, prevenindo a super-estimulação do neurônio e garantindo o funcionamento normal do sistema sensorial e motor (RODRIGUES *et al*, 2011; VAN DER OOST, BEYER, VERMEULEN 2003). A inibição da AChE pode acontecer de forma reversível ou irreversível e gera um acúmulo de acetilcolina em sinapses colinérgicas centrais e junções neuromusculares de vertebrados, levando à super-estimulação dos receptores que acaba por dessensibilizá-los, diminuindo assim a atividade colinérgica. Como consequência, a locomoção e o equilíbrio dos organismos expostos podem ser afetados (BRETAUD *et al.*, 2000). A inibição da acetilcolinesterase (AChE) tem sido particularmente bem documentada como biomarcador neurotóxico específico de exposição a pesticidas organofosforados, carbamatos, metais pesados e detergentes (DE LA TORREA *et al*, 2002; OLIVEIRA *et al*, 2007; RODRIGUES *et al.* 2011).

### 1.2.4 Estado Óxido-Redutor como Biomarcador

Há duas formas principais de eliminação de substâncias químicas nos organismos, ou elas são eliminadas em suas formas originais ou são biotransformadas. Esta biotransformação, que em geral resulta na formação de compostos mais hidrofílicos e menos tóxicos ao organismo, é realizada através de um conjunto de enzimas com ações divididas em três fases: a fase I envolve uma série de reações de oxidação, redução e hidrólise protagonizadas por monoxigenases e citocromos p-450; a fase II envolve reações de conjugação de moléculas reativas com substratos endógenos como p. ex. a glutatona reduzida; e a fase III envolve reações de catabolismo das moléculas conjugadas na fase II (VAN DER OOST, BEYER, VERMEULEN 2003).

Como consequência destas reações de síntese e degradação de biomoléculas, são formados tanto compostos constituintes de vias metabólicas essenciais, quanto moléculas altamente reativas, como os radicais livres e as espécies reativas de oxigênio (ERO's) (BOELSTERLI, 2007). Estas moléculas são instáveis e altamente reativas, pois apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica e, para atingir a estabilidade eletrônica, podem ceder o elétron ímpar ou receber elétrons de outras moléculas, inclusive moléculas orgânicas, podendo assim desestabilizar várias biomoléculas gerando um sério dano às células (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Todas as formas de vida aeróbia estão sujeitas aos efeitos oxidantes das ERO's, porém sob condições normais, elas são neutralizadas por antioxidantes que reparam grande parte dos danos causados pela oxidação. No entanto, quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de ERO's e a sua neutralização pelo sistema de defesa antioxidante, desenvolve-se um quadro celular denominado estresse oxidativo, onde radicais livres oxidam uma grande variedade de moléculas biológicas gerando graves danos às estruturas celulares (VAN DER OOST, BEYER, VERMEULEN 2003). Esta situação pode gerar uma série de efeitos como a oxidação e fragmentação de proteínas e carboidratos, carbonilação de proteínas (que as tornam hidrofóbicas e resistentes à proteólise), inativações enzimáticas, peroxidação lipídica (que leva à destruição de fosfolipídios da membrana, fazendo com que esta perca sua estrutura, fluidez e função original), oxidação da estrutura macromolecular do DNA ou do citoesqueleto, além de interferir na dinâmica da rede de microtúbulos do fuso mitótico, podendo gerar até mesmo a morte celular (VANCINI *et al.*, 2005). Todos estes danos anteriormente listados podem ser evitados através do sistema de defesa antioxidante da célula, o qual atua em duas linhas: uma detoxificadora, constituída por enzimas que detoxificam o agente antes que ele cause lesão, dentre as quais destacam-se as CYPs, a Catalase (CAT), a Glutathione-S-transferase (GST), a glutathione peroxidase, a superóxido dismutase e a vitamina E; e uma linha reparadora da lesão ocorrida, sendo constituída principalmente pelo ácido ascórbico, a glutathione-redutase e pela GSHPx, entre outros (FERREIRA E MATSUBARA, 1997).

Vários estudos de biomonitoramento relacionam o aporte de diversas classes de poluentes com a geração de ERO's, o que acaba gerando inúmeras consequências aos organismos aquáticos e aos seus respectivos ecossistemas (VAN DER OOST, BEYER, VERMEULEN 2003). Fica evidenciada desta maneira a

importância da avaliação do estresse oxidativo gerado por contaminantes, o qual torna possível o estudo do grau sub-letal de exposição a poluentes presentes no meio e, além disto, proporciona um diagnóstico antecipado de efeitos inicialmente não evidentes que a longo prazo podem representar um sério risco à comunidade local.

A seguir serão apresentados dois capítulos constando os experimentos realizados em cada etapa deste trabalho. O primeiro capítulo é referente ao experimento de exposição *in situ* com peixes transplantados para os reservatórios do Iraí e Passaúna, onde foram cultivados em tanques-rede durante seis meses. Já o segundo capítulo trata de um estudo crônico com espécies residentes do reservatório do Iraí, através do qual pretende-se comparar a sensibilidade de diversos biomarcadores em diferentes espécies.

## CAPÍTULO I

### **AVALIAÇÃO *IN SITU* DA QUALIDADE DA ÁGUA DOS RESERVATÓRIOS DO IRAÍ E PASSAÚNA – REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA, ATRAVÉS DE BIOMARCADORES EM *Oreochromis niloticus***

#### RESUMO

Estudos de avaliação da qualidade de água em reservatórios de abastecimento público frequentemente baseiam-se apenas em características físico-químicas do ambiente e alguns poucos indicadores biológicos. Entretanto, dados químicos isolados são insuficientes para o conhecimento completo acerca do potencial tóxico de misturas complexas de contaminantes, sendo mais adequado nestes casos a avaliação de bioindicadores da qualidade ambiental que possam mostrar os reais efeitos da poluição sobre organismos biológicos complexos. Neste contexto, o presente estudo objetivou utilizar biomarcadores em peixes para avaliação dos efeitos da poluição aquática nos reservatórios do Iraí e Passaúna, os quais abastecem a cidade de Curitiba e Região Metropolitana e foram avaliados pelo Instituto Ambiental do Paraná – IAP como criticamente e moderadamente degradados respectivamente. Para tal propósito, em ambos os reservatórios foram montados tanques-rede onde foram mantidos trinta peixes durante seis meses. Ao final deste período, os animais foram recapturados para análise de biomarcadores morfológicos e bioquímicos aplicados em cérebro, brânquias, fígado, músculo e gônadas. Em ambos os reservatórios, os animais apresentaram diversas lesões e alterações no fígado e algumas alterações nas brânquias e gônadas. No entanto, biomarcadores bioquímicos mostraram um quadro de estresse oxidativo maior no reservatório do Passaúna, com aumento das atividades enzimática da GST e da catalase no fígado, associado à uma redução no conteúdo de tióis totais incluindo a GSH e um aumento nos níveis de peroxidação lipídica e carbonilação protéica. Além disto, os resultados também mostraram efeitos tóxicos no cérebro dos animais deste mesmo reservatório, onde foram encontrados aumento da carbonilação protéica e do conteúdo de tióis totais e, ainda, uma inibição da atividade enzimática da AChE. Deste modo, o presente trabalho mostrou que ambos os reservatórios estudados encontram-se impactados por contaminantes com potencial tóxico e, além disto, os animais mantidos no reservatório do Passaúna apresentaram tantas alterações biológicas quanto os animais mantidos no reservatório do Iraí, apesar deste ser classificado oficialmente como mais impactado que o reservatório do Passaúna. Abre-se, portanto, uma discussão quanto a real qualidade de água dos reservatórios, sugerindo novos estudos e padrões de análise para o controle não só da qualidade da água, mas também dos impactos que margeiam estes importantes corpos d'água.

Palavras chave: reservatórios de abastecimento de água, biomarcadores em peixes, exposição sub-crônica, efeitos da poluição aquática.

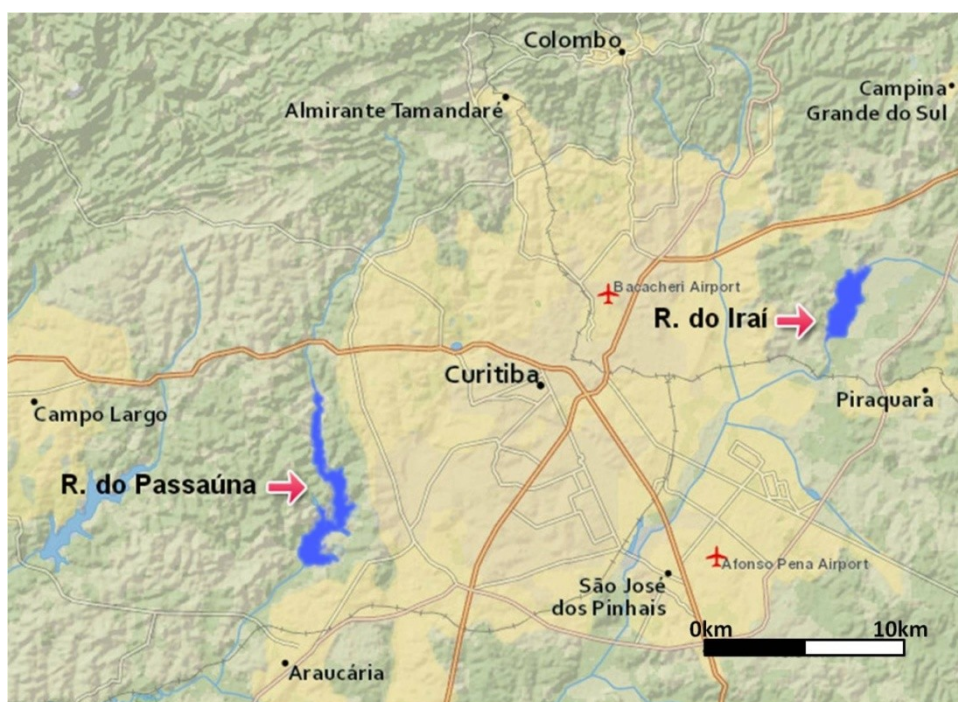
## **1. INTRODUÇÃO**

Grande parte dos órgãos responsáveis pela análise da qualidade de água em reservatórios de abastecimento público baseiam seus estudos principalmente em características físico-químicas do ambiente, assim como no levantamento dos níveis de contaminação e comparação destas concentrações com os valores limites registrados na legislação vigente. Entretanto, os dados químicos isolados são insuficientes para o conhecimento completo sobre o risco potencial de misturas complexas de contaminantes (VAN DER OOST, BEYER, VERMEULEN 2003). O ideal nestes casos seria aliar as análises tradicionais à utilização de sentinelas biológicas da qualidade ambiental, os quais poderiam indicar os reais efeitos da poluição sobre organismos biológicos complexos.

Pensando nisto, buscou-se nesta etapa do presente trabalho avaliar um modelo de estudo comparativo com peixes utilizados como bioindicadores da qualidade de água em dois reservatórios de abastecimento público da região metropolitana de Curitiba: Iraí e Passaúna.

### **1.1 OS RESERVATÓRIOS DE ABASTECIMENTO URBANOS**

O município de Curitiba e sua Região Metropolitana são supridos por um sistema integrado de abastecimento (Iguaçu, Iraí, Passaúna e Miringuava), sendo os reservatórios do Iraí e Passaúna (FIGURA 1), que pertencem à bacia hidrográfica do Rio Iguaçu, alguns dos maiores utilizados no abastecimento público e os escolhidos para a realização deste trabalho. Inicialmente também foi prevista a avaliação do reservatório do Piraquara como uma referência de reservatório pouco impactado, entretanto, devido às adversidades encontradas no final do experimento, foi impossibilitada a utilização deste reservatório no presente trabalho.

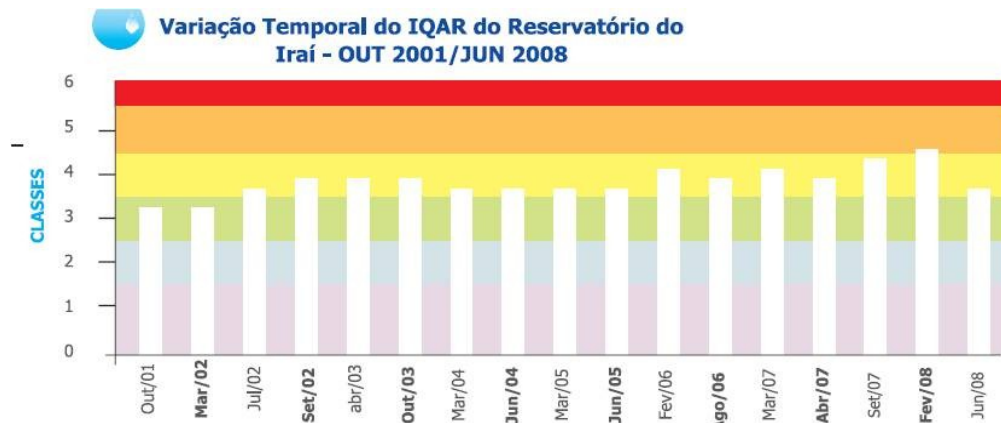


**FIGURA 1:**Localização dos Reservatórios do Iraí e do Passaúna, Paraná, Brasil. (Mapa produzido pela autora através de ferramenta disponível em [http://education.nationalgeographic.com/education/mapping/interactive-map/?ar\\_a=1](http://education.nationalgeographic.com/education/mapping/interactive-map/?ar_a=1) – Acesso em 05/02/2013)

O reservatório do Iraí foi construído em 2000 na Área de Proteção Ambiental (APA) do Iraí, (Decreto Estadual nº 1753 de 06/05/93), com fins de abastecimento público de água e controle de cheias do rio Iraí. Ele encontra-se dentro da sub-bacia do rio Iraí ( $25^{\circ}24'3''S, 49^{\circ}5'37''W$ ), e seus principais contribuintes são os rios Canguiri, Timbu e Currálinho (IAP, 2009). A represa sofre forte potencial de impacto devido as atividades desenvolvidas no entorno da região, como a intensa ocupação demográfica, a construção de rodovias movimentadas, assim como a agricultura e a atividade industrial (Xavier, 2005). O impacto sobre a qualidade da água deste reservatório foi demonstrado no relatório produzido pelo IAP, onde o reservatório do Iraí foi avaliado como criticamente degradado à poluído (FIGURA 2), com características de eutrofização, elevada densidade de cianobactérias e alto teor de matéria orgânica, encontrando-se fora dos padrões aceitáveis para reservatórios destinados ao abastecimento público (IAP, 2009b).

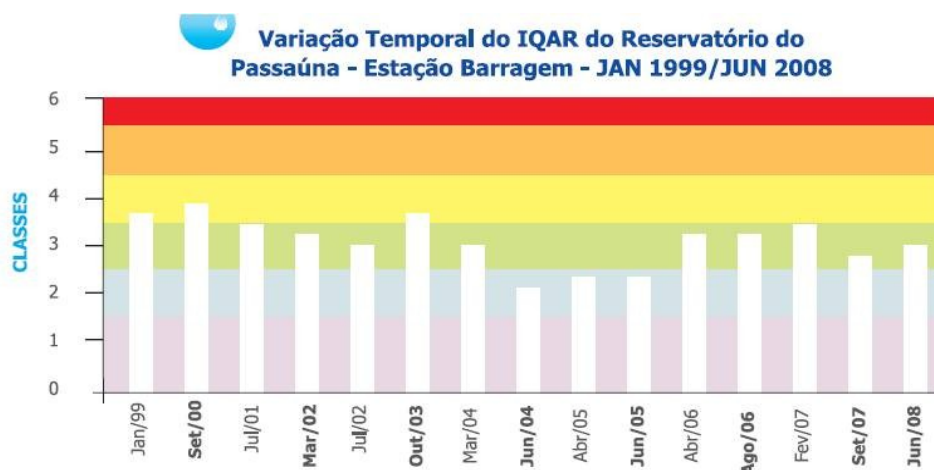
O reservatório do Passaúna foi formado em 1989 e está inserido dentro da área de proteção da APA do Passaúna (criada em 1991), abrangendo os municípios de Almirante Tamandaré, Campo Magro, Curitiba, Campo Largo e Araucária. Destacam-se em seu entorno as atividades industriais e agrícolas como cultivo de batatas, com uso intensivo de fertilizantes e agrotóxicos (XAVIER 2005,

ANDREOLI *et al.* 2003). Este reservatório foi avaliado pelo IAP como moderadamente degradado (FIGURA 3), com característica mesotrófica (com tendência a eutrofização), poucas cianobactérias, altas taxas de oxigênio distribuído próximas à superfície e baixas taxas nas regiões mais profundas, mantendo-se ainda dentro dos limites considerados aceitáveis para utilização do manancial para abastecimento público (IAP, 2009).



**Classificação Final IQAR (2001/2008): 4,0 – Criticamente Degradada a Poluído**

**FIGURA 2:** Variação no Índice de Qualidade de Água de Reservatórios (IQAR) avaliado pelo IAP entre 1999 e 2008, Reservatório do Iraí (Fonte: IAP, 2009)



**Classificação Final IQAR (1999/2008): 3,1 – Moderadamente Degradado**

**FIGURA 3:** Variação no Índice de Qualidade de Água de Reservatórios (IQAR) avaliado pelo IAP entre 1999 e 2008, Reservatório do Passaúna. (Fonte: IAP, 2009)

## 1.2 O MODELO BIOLÓGICO

O modelo biológico escolhido para esta etapa do trabalho foi a espécie popularmente conhecida como tilápia do Nilo, uma espécie de relevante valor comercial e que vem sendo bastante utilizada em estudos de ecotoxicologia.

A tilápia-do-nilo, ou *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), é um peixe de origem africana, pertencente à família Cichlidae. Esta espécie ocorre em uma grande diversidade de ambientes de água doce e pode atingir até 60cm e 4Kg de peso corpóreo. Possui hábito alimentar onívoro e filtrador, alimentando-se principalmente de fitoplâncton, algas bênticas e detritos (FATTAH e SAYED, 2006). Foi introduzida no Brasil por volta da década de setenta e atualmente distribui-se em grande parte do território nacional (BOSCOLO *et al*, 2001). A ampla distribuição das tilápias do Nilo mostra a alta resistência desta espécie, a qual pode tolerar grandes variações de temperatura (12-42°C, mas preferem temperaturas de 28-30°C), baixa disponibilidade de oxigênio (0,01ppm), e são também moderadamente eurialinas (FATTAH e SAYED, 2006).



**FIGURA 4:** *Oreochromis niloticus*. (Fonte: <http://www.scandfish.com/> Acesso em 10/12/2012)



## **2. OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Avaliar de forma comparativa respostas biomarcadoras em peixes cultivados em tanques-rede mantidos em dois reservatórios impactados da região metropolitana de Curitiba (Reservatórios do Iraí e Passaúna).

### **Objetivos específicos**

- Avaliar a morfologia histológica de gônadas e fígado através de microscopia óptica;
- Avaliar a ultraestrutura dos arcos branquiais através de técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- Avaliar a condição de estresse oxidativo em fígado através de análises biomarcadores bioquímicos;
- Avaliar a neurotoxicidade através da atividade da enzima acetilcolinesterase em músculo e cérebro;

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS - DESENHO EXPERIMENTAL

No presente estudo, indivíduos da espécie *Oreochromis niloticus* foram mantidos em tanques-redes para comparação qualitativa da qualidade de água dos reservatórios do Iraí, Passaúna e Piraquara I. Optou-se pela metodologia de exposição dos animais utilizando-se tanques-redes devido as vantagens que este modelo poderia proporcionar ao estudo, como por exemplo, permitir uma maior padronização das condições experimentais, do tamanho dos animais, da frequência de alimentação ou mesmo do local de exposição dentro do reservatório, fazendo com que a influência destas condições sobre as variáveis analisadas como biomarcadores fosse menor, enquanto a influência da poluição (condição de interesse neste estudo) acaba tendo maior destaque nestas mesmas variáveis. Em cada reservatório foi montado um tanque-rede de 2m<sup>2</sup>, no qual foram alocados trinta indivíduos provenientes da Piscicultura Panamá, localizada no município de Paulo Lopes, em Santa Catarina, em uma localização relativamente livre de fontes de contaminação.

Os peixes foram mantidos nos tanques-rede durante seis meses (Abril à Outubro/2011), onde foram alimentados com ração comercial a cada dois dias. Ao final deste período, foi programada a coleta do material biológico, na qual foram recapturados 18 indivíduos nos reservatórios do Iraí e Passaúna e nenhum indivíduo no reservatório de Piraquara I. Os motivos para a perda dos animais alocados no reservatório de Piraquara I são desconhecidos, mas não é descartada a possibilidade de predação por lontras, que são comuns na região. Os animais recapturados foram anestesiados com benzocaína 0,05% e sacrificados através de secção vertebral para coleta dos tecidos (fígado, brânquias, gônadas, cérebro e músculo). Durante as coletas, foram mensurados o comprimento padrão e o peso total de cada um dos indivíduos, e os órgãos retirados foram em parte armazenados a -80°C para análises posteriores. Para microscopia de luz foram amostrados fígado e gônadas, e para microscopia eletrônica de varredura foram coletados o segundo arco branquial direito de metade dos indivíduos.

#### 3.1 FATOR DE CONDIÇÃO

Como ambos os grupos de *O. niloticus* eram provenientes de um mesmo lote e foram mantidos sob condições experimentais semelhantes, optou-se por assumir o

crescimento isométrico para utilização do fator de condição de Fulton. Desta forma, foi utilizado um coeficiente de regressão fixo e igual a 3,0. O cálculo foi efetuado segundo a fórmula:  $K_F = (W / L^3) \times 100$  (Obs:  $K_F$  = Fator de condição de Fulton,  $W$  = Peso corporal em gramas e  $L$  = Comprimento corporal total em centímetros)(FROESE, 2006).

### 3.2 HISTOPATOLOGIA DE FÍGADO E GÔNADAS

As mostras de fígado e gônada coletadas foram fixadas através de imersão em ALFAC (etanol, formaldeído e ácido acético glacial) durante 16 horas e então foram armazenadas em álcool 70% a 4°C . Posteriormente as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol, diafanizadas em xilol, incluídas e emblocadas em resina Paraplast (SIGMA). Então foram realizados cortes histológicos de 5µm de espessura, os quais foram montados em lâminas de vidro, corados com Hematoxilina de Harris e Eosina (HE) e analisados ao microscópio óptico.

As lesões encontradas durante a análise das lâminas de fígado foram quantificadas de acordo com o Índice de Bernet (BERNET *et al.* 1999). Para cada alteração foi atribuído um fator de importância ( $w$ ) de acordo com o grau de reversibilidade, sendo (1) para alterações facilmente reversíveis; (2) para alterações moderadas, potencialmente reversíveis com o fim da exposição, e (3) para alterações irreversíveis, que levem a perda parcial ou total da função do órgão (TABELA 1). Além disto, cada amostra foi pontuada com um segundo valor numérico ( $\alpha$ ) de acordo com a extensão ou frequência de cada alteração (de 0 – ausente - a 6 – abundante/extenso). A partir disto, foi possível obter o índice de alterações histopatológicas (IH) de cada amostra através da multiplicação de  $w$  por  $\alpha$  para cada alteração e a seguinte soma do total de alterações para cada amostra, como mostra a fórmula abaixo (BERNET *et al.*, 1999):

$$IH = \sum_{rp} \sum_{alt} (a_{orgrpalt} \times w_{orgrpalt})$$

Onde:

org = órgão (constante); rp = padrão de reação; alt = alteração; a = valor de pontuação; w = fator de importância.

**TABELA 1:** Fator de importância das alterações consideradas na análise histopatológica de acordo com Bernet et al. (1999).

Lesão	Necrose	Resposta Inflam.	Parasitas	Neoplasias	Dif. Tecidual	Vacuol.	Inclusão citoplasm.
Fator de Importância (w)	3	2	2	3	3	2	1

\* Palavras abreviadas: resposta inflamatória; diferenciação tecidual; vacuolização; inclusão citoplasmática

Além da quantificação das lesões, também foi contabilizada a presença de centros de melanomacrófagos (CMMs) nos cortes histológicos de fígado. Os CMMs foram contados em toda a área do corte utilizando-se um sistema-teste quadriculado acoplado a uma das oculares do microscópio. Este sistema quadriculado possui área total de 1mm<sup>2</sup>, dividida em quadrados de 0,01mm<sup>2</sup>.

### 3.3 HISTOPATOLOGIA DE BRÂNQUIAS

Os animais de número par na ordem de coleta tiveram o segundo arco branquial do lado direito coletado para análise por microscopia eletrônica de varredura. As amostras foram fixadas em glutaraldeído 3% / tampão cacodilato (0,1 M, pH 7,2-7,4), e posteriormente desidratadas em série crescente de etanol (MERCK®) e processadas até a completa desidratação no ponto crítico utilizando CO<sub>2</sub> líquido. As amostras foram então metalizadas com ouro para posterior análise em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM – 6360 LV Scanning Electron Microscope (300 mil X) no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR. Foram consideradas as seguintes alterações branquiais: aneurismas, hipertrofia, hiperplasia, proliferação celular, alterações no epitélio, necrose e morte celular, alterações estruturais, fusão lamelar, atrofia lamelar, presença de parasitas e ocorrência de neoplasias.

### 3.4 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

As amostras de tecido coletadas para a realização de análises bioquímicas e químicas foram inicialmente armazenadas à -80°C. Posteriormente, 0,2 gramas das amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH7,5 (para cérebro e músculo) e tampão-fosfato salino (PBS) 0,1M, pH 7,2 (para amostras de

fígado), em seguida centrifugadas a 12.000 x g durante 20 min à 4°C, e então o sobrenadante foi aliquotado para as análises correspondentes (cérebro – quantificação de proteínas, AChE, GSH e PCO; músculo – quantificação de proteínas e AChE; Fígado – contagem de proteínas; GSH, GST, LPO, PCO e Catalase).

As quantificações de proteínas totais foram realizadas através do método de Bradford *et al.* (1976), onde foram utilizadas alíquotas de 10 µl de sobrenadante diluído seguidos de 250 µl do reativo de Bradford (“Coomassie brilliant blue” BG-250), procedendo as leituras de absorbância na faixa de 595-620 nm. A concentração de proteínas foi determinada a partir da comparação dos valores de absorbância com aqueles provenientes de curva-padrão de BSA realizada em paralelo nas concentrações de 0, 125, 250, 500, e 1.000 µg de BSA por ml de volume final de solução utilizando PBS como branco (BRADFORD, 1976).

### **3.4.1 ACETILCOLINESTERASE EM MÚSCULO E CÉREBRO**

O protocolo desenvolvido foi baseado na metodologia descrita em ELLMAN *et al.* (1961), modificado para microplaca por SILVA DE ASSIS (1998). A técnica é baseada na exposição da amostra e do reagente DTNB (5,5-Ditio-bis-2-nitrobenzoato) ao substrato acetiltiocolina. Este substrato é hidrolisado pela AChE em tiocolina e acetato, sendo que a tiocolina resultante reage com o DTNB gerando o ânion 5-Tio-2-nitrobenzoato responsável pelo aparecimento de coloração amarela que pode ser monitorado pelo aumento de absorbância a 415 nm. Após a quantificação de proteínas totais nas amostras de cérebro e músculo, alíquotas do sobrenadante foram normalizadas para 2 mg de proteína/ml e pipetadas em triplicata de 20 µl em microplacas de 96 poços (no branco foi pipetado 20 µl de tampão fosfato de potássio), seguido de 130 µl de DTNB (5,5-ditio-bis-2nitro-benzoato) 0,75 mM e 50 µl de substrato acetiltiocolina (iodeto de atiltiocolina) à 9 mM imediatamente antes da leitura. Ao final foram feitos seis ciclos de leituras em espectrofotômetro de microplaca a 405 nm, com intervalos de 52 segundos cada. Os resultados foram expressos em nanomoles de acetitiocolina hidrolisada x min<sup>-1</sup> x mg de proteína<sup>-1</sup>.

### **3.4.2 CONCENTRAÇÃO DE TIÓIS NÃO-PROTÉICOS (GSH E OUTROS TIÓIS)**

Foram adicionados 50 µl de solução de ácido tricloroacético (TCA) a 50% em 300 µl de amostras para precipitação proteica (no branco foram 50 µl de TCA em 300 µl de Tampão fosfato de potássio 0,1M, pH7,5 no caso da análise em tecido cerebral e PBS 0,1M, pH 7,2 no caso do tecido hepático). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5.000 x g por 10 min a 4°C, e então pipetadas em tréplicas de 50 µl, junto com o branco do tampão e a curva-padrão da GSH (0, 1.25, 2.5, 5.0, 10 µg de GSH . ml<sup>-1</sup>) em microplacas de 96 poços, seguidos de 230 µl de tampão Tris-Base 0,4 M, pH 8,9, e 20 µl de DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico) a 2,5 mM (em metanol 16% e tampão Tris-base 0,4 M, pH 8,9). As medidas de absorbância foram lidas a 415 nm em espectrofotômetro Sunrise-TECAN e a determinação do conteúdo de tióis não proteicos foi feita comparando-se à curva-padrão de GSH (SEDLAK e LINDSAY, 1968). A concentração de tióis foi expressa em nanomoles de tióis x mg de proteínas<sup>-1</sup>.

#### **3.4.3 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO)**

A análise de degradação de ácidos graxos foi baseada no Método FOX (Ferrous Oxidation / Xylenol Orange Method) - (JIANG et al., 1991, 1992), que baseia-se na rápida oxidação do Fe<sup>+2</sup> mediada por peróxidos sob condições ácidas e posterior formação do complexo Fe<sup>+3</sup> - laranja de xilenol na presença do estabilizador hidroxitolueno butilado, que absorve luz a 550-570 nm. Para a reação foram utilizados 200 µl do sobrenadante de fígado e 800 µl de meio de reação contendo laranja de xilenol dissodico 100 µM, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>25mM, sulfato ferroso amoniacal hexahidratado (FeSO<sub>4</sub>.NH<sub>4</sub>) 250 µM e hidroxitolueno butilado (BHT) 4,0mM, e o sobrenadante foi pipetado em duplicatas (200 ul) em microplacas de 96 poços e a absorbância foi medida a λ= 550-570 nm em espectrofotômetro Sunrise-TECAN. Os resultados foram expressos em nanomoles de hidroperóxidos x mg de proteína<sup>-1</sup>.

#### **3.4.4 CARBONILAÇÃO PROTEÍCA**

Proteínas podem ser oxidadas / carboniladas durante processo de estresse oxidativo. Portanto, buscou-se avaliar também os danos estruturais em proteínas (especificamente a formação de grupos aldeídicos e cetônicos) (LEVINE et al. 1994;

e QUINLAN e GUTTERIDGE, 2000). O método consiste em reagir o 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) com as proteínas carboniladas, formando dinitrofenil-hidrazonas que podem ser detectadas a 358-370 nm, entretanto, o método não detecta carbonilas com grupos funcionais como ác. carboxílicos, amidas e ésteres que não reagem como o DNPH. Foram utilizadas alíquotas de 200 µl de sobrenadante de cérebro e fígado normalizadas para 2 mg de proteína/ml, onde foram adicionados 500 µl de meio de reação contendo DNPH a 10 mM, preparado em HCl a 2 M (e 500 µl de HCl nos tubos brancos, sem adição de DNPH) e, após 90 minutos de incubação a 37°C, foram adicionados mais 700 µl de ácido tricloroacético 28% para precipitação proteica com posterior centrifugação e lavagem por ressuspensão em etanol/acetato de etila 1:1 v:v. As proteínas foram então solubilizadas em hidrocloreto de guanidina a 6 M e centrifugadas. O conteúdo de carbonilas foi determinado em espectrofotômetro Sunrise-TECAN ( $\lambda = 360$  nm) em microplacas utilizando o coeficiente de absorção molar de  $2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  para hidrazonas. Os resultados foram expressos µmol carbonilas por  $\text{mg}^{-1}$  de proteína.

#### **3.4.5 ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE**

A metodologia foi baseada na técnica descrita por KEEN et al., 1976, com algumas modificações. Após determinação da concentração de proteínas do sobrenadante das amostras de fígado, as amostras foram normalizadas para 1,0 mg/ml e pipetadas em triplicata (20 µl) em microplacas de 96 poços (no branco foi pipetado 20 µl de tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 6,5). Então foram pipetados 180 µl do meio de reação contendo GSH 1,5 mM e CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) 2 mM em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,5 e a leitura em espectrofotômetro (Sunrise-TECAN) foi realizada imediatamente em seguida a  $\lambda = 340$  nm com oito leituras e intervalos de 52 segundos cada, perfazendo um tempo total de 364 segundos. Nesta metodologia, a GST catalisa a reação do substrato CDNB com o GSH, formando um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento de absorbância a 340 nm. O aumento gradual na absorbância foi monitorado no espectrofotômetro Sunrise-TECAN, a 340nm e a atividade foi expressa em µmoles de tioéter formado  $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}$  de proteína<sup>-1</sup>.

### **3.4.6 ATIVIDADE DA CATALASE**

A análise da atividade da Catalase foi baseada na técnica descrita por AEBI (1984), cujo princípio se dá pelo decréscimo de absorbância a 240 nm devido à degradação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Após determinação da concentração de proteínas do sobrenadante das amostras de fígado, as amostras foram normalizadas para 1,0 mg/ml e então foram pipetados 10 µl destas em 990 µl de meio de reação em cubeta de quartzo. A solução foi misturada por inversão e a absorbância foi medida em seguida em espectrofotômetro de cubeta a 240 nm, com um tempo de leitura total de 60 segundos a intervalos de 1 segundo (experimento realizado em triplicatas).

### **3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados das análises bioquímicas, contagem de centros de melanomacrófagos e do fator de condição foram avaliados através de teste t de Student não pareado, com nível de significância de 0,05, comparando-se os grupos de cada reservatório. Para os resultados de microscopia de luz (Índice de Bernet) foi aplicada uma análise não-paramétrica de Mann-Whitney, também com significância de 0,05. Os resultados das análises de brânquias através de microscopia eletrônica de varredura e das gônadas através de microscopia óptica foram apenas descritivos.



#### 4. RESULTADOS

O reservatório de Piraquara I, dos três selecionados para este trabalho, é o que historicamente tem se mostrado menos afetado por interferências antrópicas, o que motivou durante o planejamento deste projeto a utilização deste reservatório como controle negativo de poluição. Com a perda do grupo referente a este reservatório e a impossibilidade de repetição do experimento, o trabalho ficou restrito à avaliação dos reservatórios do Iraí e do Passaúna.

Foram coletados dezoito indivíduos no reservatório do Iraí e dezoito no Passaúna, totalizando assim 36 animais. Na TABELA 2 são apresentadas as médias encontradas para o peso e os comprimentos total e padrão dos animais coletados, assim como as médias de fator de condição de cada grupo, o qual foi significativamente maior no grupo mantido no reservatório do Passaúna.

**TABELA 2:** Informações sobre peso, comprimento e fator de condição. CT – Comprimento total e CP – Comprimento padrão.

Local	Peso (gramas)	CT(cm)	CP (cm)	Fator de Condição
Iraí	115,71 ± 30,07	17,47 ± 1,53	13,89 ± 1,40	2,10 ± 0,052 ***
Passaúna	90,05 ± 10,08	15,61 ± 0,65	12,82 ± 0,51	2,36 ± 0,023 ***

Obs: os valores expressam média ± erro médio; \*\*\*diferença significativa entre as médias,  $p < 0,05$ .

##### 4.1 HISTOPATOLOGIA DO FÍGADO E GONADAS

As amostras de fígado analisadas apresentaram parênquima hepático contendo hepatócitos poligonais com núcleos e nucléolos proeminentes, vasos sinusóides e vasos sanguíneos distribuídos irregularmente entre os hepatócitos, ductos e canais biliares também distribuídos irregularmente pelo parênquima hepático, além de um tecido pancreático difuso no parênquima hepático (hepatopâncreas), em geral localizado próximo a vasos sanguíneos (GENTEN, TERWINGHE E DANGUY, 2009). Entre as diversas lesões encontradas no tecido hepático e pancreático (FIGURA6), as necroses foram as lesões mais frequentes (100% dos indivíduos), principalmente no grupo do reservatório do Passaúna (TR-Passaúna), que apresentou indivíduos com lesões de caráter mais severo. Na TABELA 3 são apresentadas as principais lesões encontradas no fígado, bem como

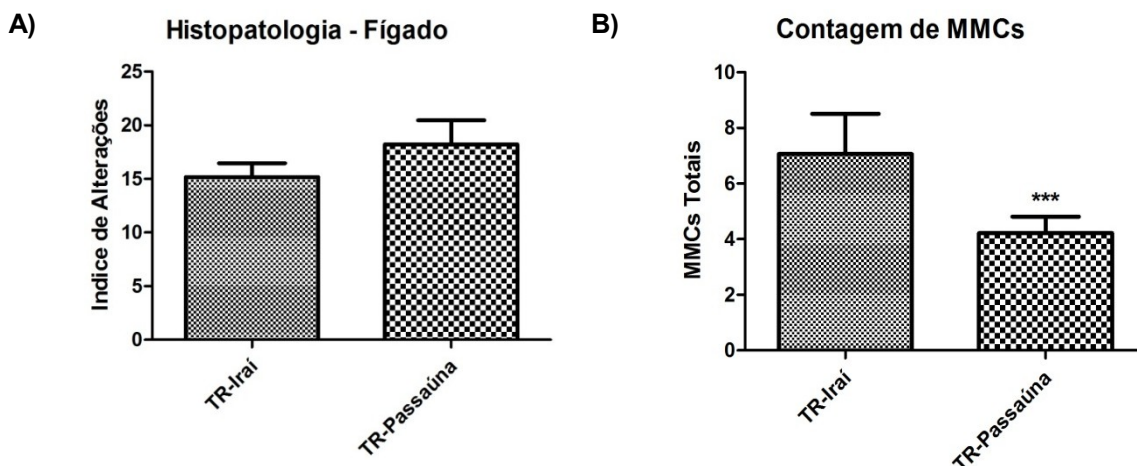
o número de indivíduos afetados e o grau de extensão das lesões encontradas em cada amostra.

**TABELA 3:** Avaliação comparativa da ocorrência de alterações nos cortes histológicos de fígado em *O. niloticus* de ambos os reservatórios avaliados.

	TR-Iraí (n=17)	TR-Passaúna (n=18)
Necrose	17(9+, 8++)	18 (11+, 3++, 4+++)
Infiltração Leucocitária	12(11+, 1++)	8 (6+, 1++, 1+++)
Parasitas	14 (+)	14 (7+, 7++)
Diferenciação celular	0	1 (+)
Esteatose	0	1 (+)
Colestase	4 (+)	3 (+)

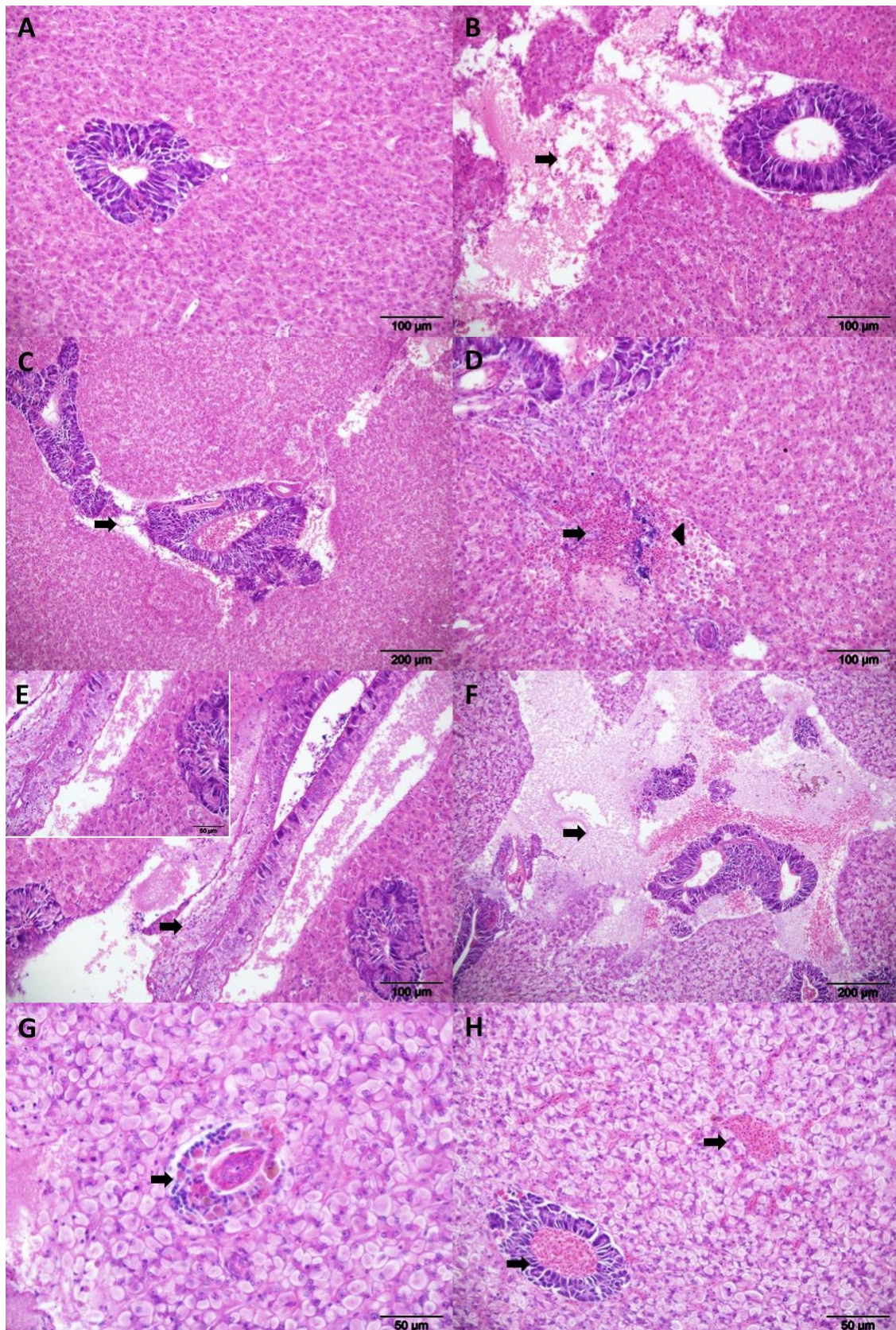
Extensão das alterações: + pouco afetado, ++ moderadamente afetado, +++ muito afetado.

As lesões encontradas foram avaliadas através do Índice de Bernet, o qual permitiu agrupar as diferentes lesões e alterações teciduais do órgão e comparar os valores médios obtidos para cada grupo. Apesar do grupo TR-Passaúna ter apresentado algumas lesões de caráter mais severo que o grupo do Iraí, não foram encontradas diferenças significativas para o Índice de Bernet de ambos os grupos (FIGURA 5A). Por outro lado, o grupo TR-Iraí apresentou um número significativamente maior de centros de melanomacrófagos (FIGURA 5B).



**FIGURA 5:** Avaliação histopatológica do fígado após exposição nos reservatórios de Iraí e Passaúna. (A) Médias dos valores de índices de lesão obtidos em cortes histológicos de fígado em *O. niloticus* segundo Bernet *et al.* (1999). (B) Quantificação dos centros de melanomacrófagos no fígado dos mesmos indivíduos. Os dados expressam média ± erro padrão. Obs: Significância: \*\*\* -  $p < 0,001$ .

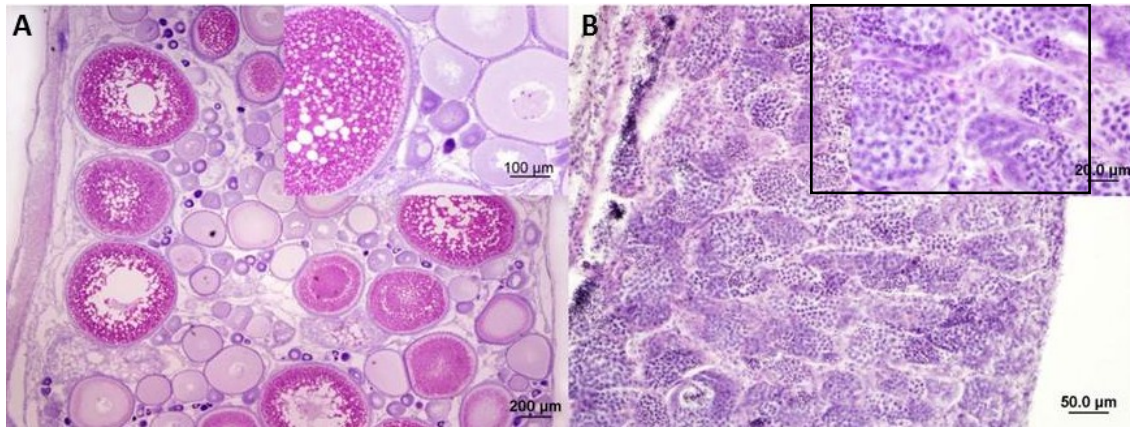




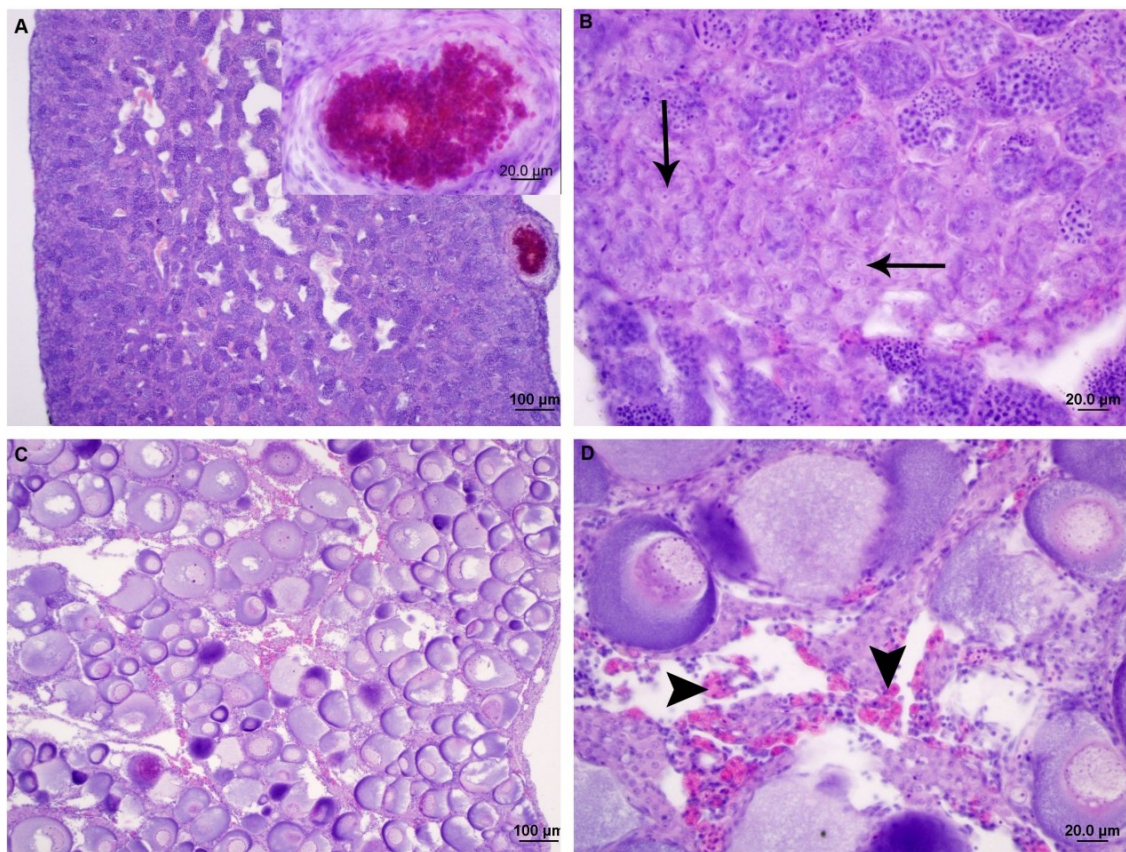
**FIGURA 6:**Microscopia de luz de fígado. A – D grupo TR-Iraí: A – Parênquima hepático e pancreático com aspecto normal; B – Extensa área com necrose; C – Necrose ao redor do tec. Pancreático; D – Necrose com hemorragia (seta) e infiltração leucocitária (cabeça da seta); E – H - grupo TR-Passaúna: E – Degeneração do tecido pancreático (no detalhe é mostrada a região da seta em maior aumento, escala = 50µm); F – Extensa área de necrose no tecido hepático; G – Centro de melanomacrófagos e infiltração leucocitária associados ao canalículo biliar; H – Congestão Vascular;

As gônadas analisadas apresentaram características normais (FIGURA 7) conforme descrito em Genten, Terwinghe e Danguy (2009), onde foram encontradas células germinativas em diferentes estágios de desenvolvimento: espermatogônias (células grandes com citoplasma eosinófilo e um núcleo contendo uma cromatina densa), espermatócitos (menores, com pouco citoplasma e núcleo mais basófilo), espermátides (células com muito pouco citoplasma e núcleo altamente basófilo e cromatina bem condensada) e espermatozóides (as menores células deste tecido). Os ovários, por sua vez, estavam envolvidos pela túnica albugínea, a partir da qual se projetavam as lamelas ovígeras, contendo células foliculares, oogônias e oócitos em diferentes estágios de desenvolvimento: pré-vitelogênicos (células arredondas com citoplasma reduzido e basófilo, núcleo grande com cromatina frouxa dispersa pelo nucleoplasma e vários nucléolos proeminentes próximos a membrana nuclear, as células aumentavam progressivamente seu diâmetro ao longo do desenvolvimento primário), e vitelogênicos (numerosos grânulos de vitelo – grânulos de yolk – ocupando os oócitos e a zona radiata era altamente desenvolvida). Foram encontradas poucas alterações nas gônadas analisadas, sendo que apenas alguns indivíduos de ambos os grupos apresentaram infiltrações leucocitárias e parasitas (possivelmente da espécie *Sphaerothecum destruens*), duas fêmeas do grupo TR-Passaúna apresentaram folículos atrésicos, um macho no grupo Iraí apresentou uma deposição similar a grânulos vitelogênicos (FIGURA8) e um macho no grupo Passaúna apresentou agrupamentos de células germinativas neoplásicas (FIGURA9).

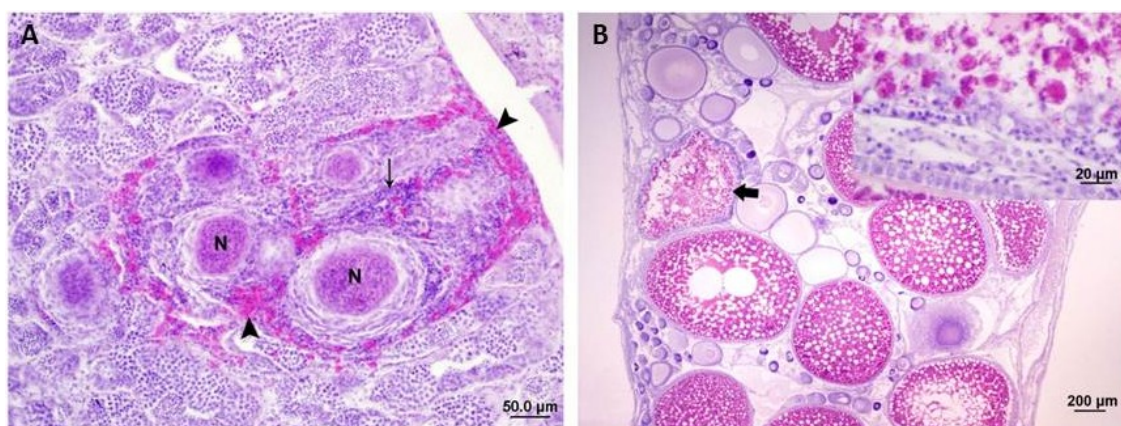




**FIGURA 7:** Corte histológico de gônada de *O. niloticus*. A – Corte de ovário mostrando oócitos em diferentes estágios de maturação. B – corte de testículo apresentando estrutura normal com diferentes estágios de desenvolvimento dos espermatozoides.



**FIGURA 8:** Corte histológico da gônada *O. niloticus* do reservatório do Iraí. A – Detalhe mostrando deposição similar a vitelo (sem formação de oócito) próximo à parede do testículo. B- Células germinativas masculinas em estágios iniciais de maturação, com predominância de espermatogônias (setas). C – Oócitos em estágios iniciais de desenvolvimento, com ausência de folículos vitelogênicos. D – Presença de parasitas no ovário.



**FIGURA 9:** Corte histológico da gônada *O. niloticus* do reservatório do Passaúna. A – Presença de parasitas (cabeças de setas), infiltração leucocitária (seta) e células germinais neoplásicas (N) no testículo. B – Folículo atrésico (seta) e detalhe mostrando alteração das células foliculares escamosas.

#### 4.2 ARQUITETURA DAS BRÂNQUIAS

As brânquias analisadas apresentaram-se organizadas em quatro arcos branquiais de cada lado do corpo, com cada arco contendo duas fileiras de lamelas primárias que por sua vez sustentam as lamelas secundárias onde ocorre a troca gasosa (FIGURAS 10 e 11 A). O epitélio branquial na lamela primária é constituído por células pavimentosas, células secretoras de muco que conferem proteção física ao tecido e células de cloreto, estas geralmente localizadas na base da lamela secundária. A lamela secundária possui o epitélio formado por uma camada única de células pavimentosas, apoiada na membrana basal que reveste as células pilares, cujos prolongamentos delimitam o espaço por onde circula o sangue (WILSON E LAURANT, 2002).

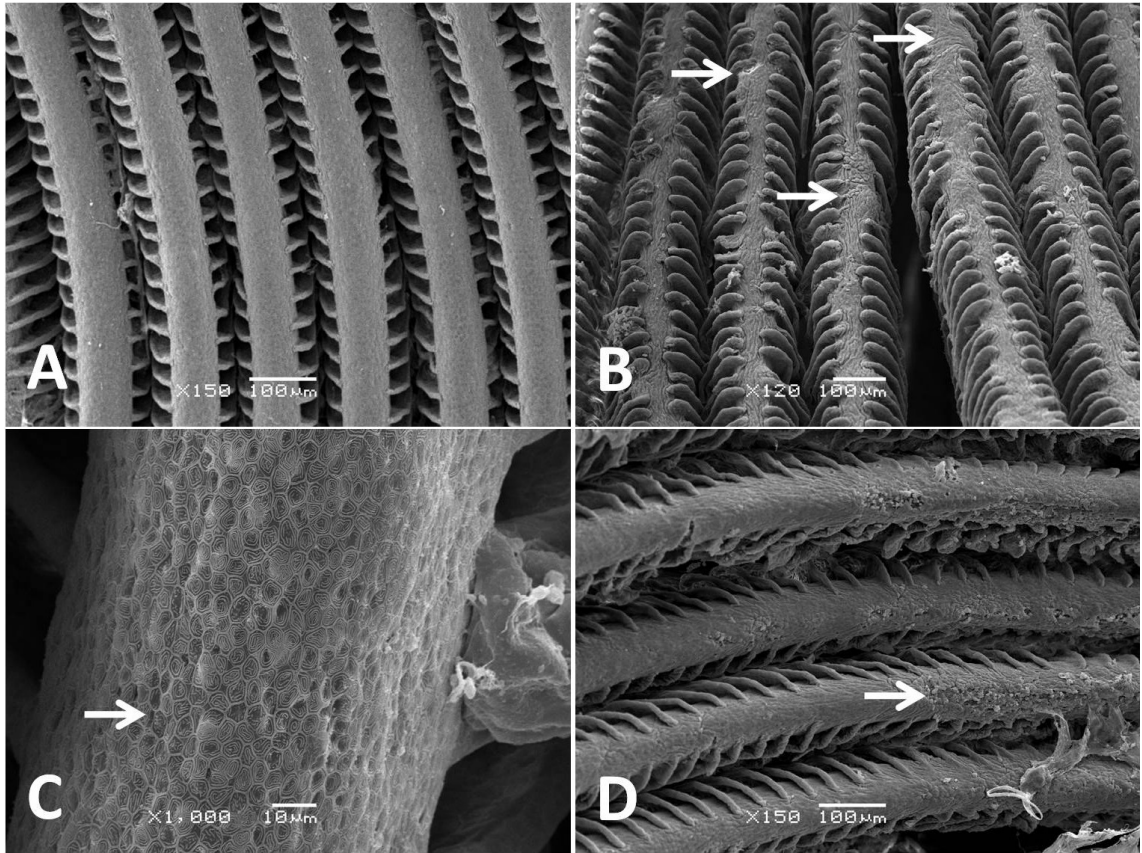
As lesões e alterações encontradas nas brânquias de *O. niloticus* expostos nos reservatórios do Iraí e Passaúna encontram-se resumidas na TABELA 4. O grupo do tanque-rede do Iraí apresentou 2 vezes mais hipertrofias que o grupo do reservatório do Passaúna, além de 3 vezes mais alterações estruturais e fusão lamelar, e ainda uma frequência 50% maior de atrofia (TABELA 4). Algumas das alterações mais evidentes encontradas nas brânquias dos grupos TR-Passaúna e TR-Iraí podem ser observadas na FIGURA 10 e 11 respectivamente.



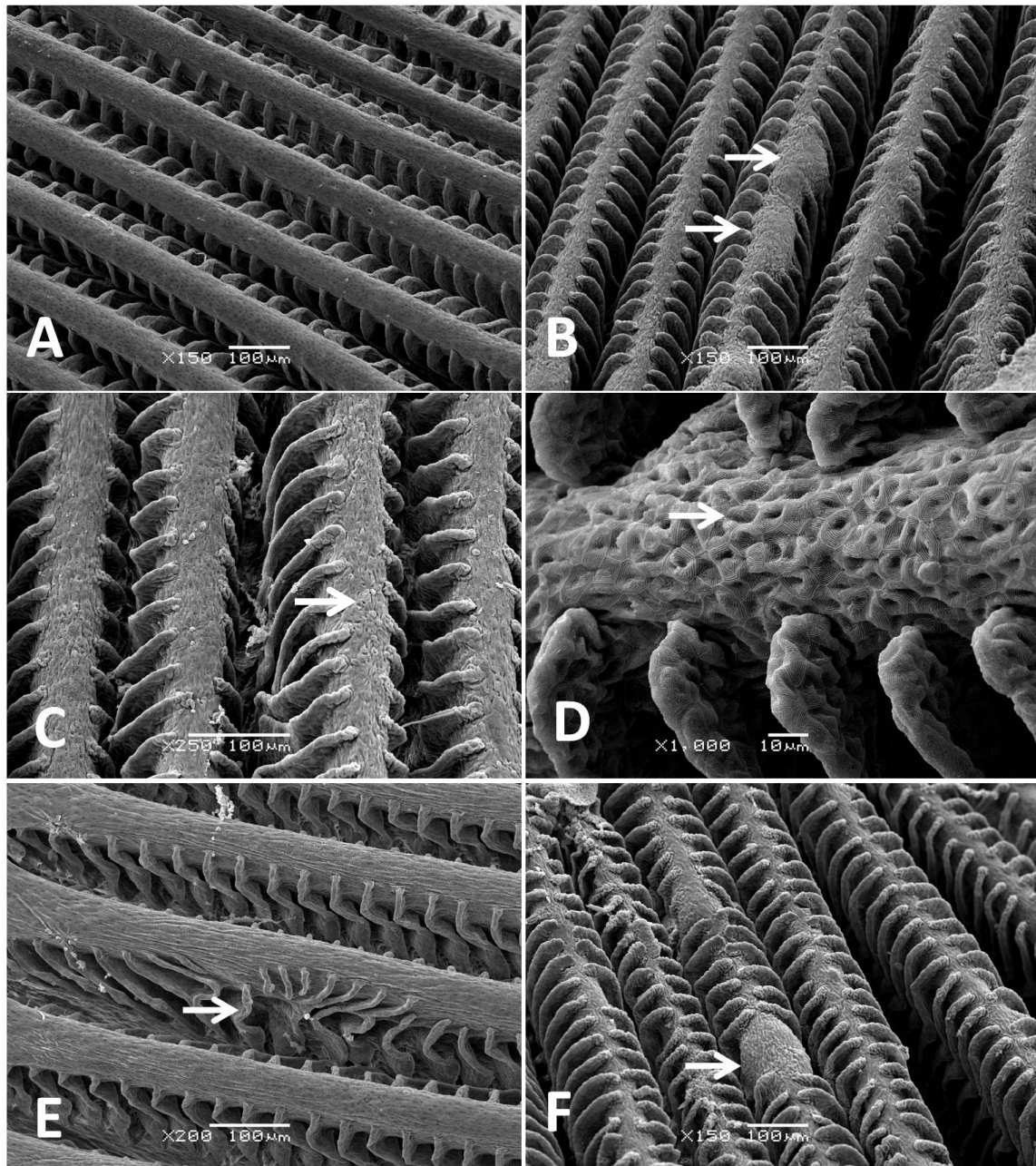
**TABELA 4:**Frequências relativas de alterações encontradas nas brânquias de cada grupo. TRI – Grupo Tanque-rede Iraí; TR-Ps – Grupo Tanque-rede Passaúna

Grupos	(n)	Frequências relativas (%)									
		Hiperplasia	Hipertrofia	Proliferação Celular	Alt. epiteliais	Morte Celular	Alt. estruturais	Fusão Lamelar	Atrofia	Parasitas	
TR-I	10	30	50	30	60	40	30	30	30	0	
TR-Ps	9	0	22	11	56	44	11	11	22	22	

Total de indivíduos do grupo (n)



**FIGURA 10:** Histopatologia de Brânquias grupo TR-Passaúna. A – brânquia inalterada apresentando lamelas primárias e secundárias normais; B – diversos eventos de hipertrofia nas lamelas primárias (seta); C – Redução do tamanho e aumento do número de células epiteliais nas lamelas primárias; D – Necrose e descarte celular no epitélio das lamelas primárias (seta).



**FIGURA 11:** Histopatologia de Brânquias grupo TR-Iraí. A – brânquia inalterada apresentando lamelas primárias e secundárias normais; B – hipertrofia nas lamelas primárias (setas); C – Morte celular nas lamelas primárias (seta) ; D – Alterações no epitélio da lamela primária (seta); E – Alterações estruturais nas lamelas secundárias (seta); F – Hipertrofia na lamela primária associada a atrofia de lamelas secundarias (seta);



### 4.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS – CÉREBRO, MÚSCULO E FÍGADO

O grupo proveniente do tanque-rede Passaúna apresentou níveis maiores de peroxidação lipídica (LPO) e carbonilação proteica (PCO) no fígado em relação ao grupo do tanque-rede Iraí, bem como valores maiores para a atividade das enzimas glutathione-S-transferase (GST) e catalase hepáticas. No entanto, os níveis de tióis não protéicos incluindo a GSH diminuíram neste tecido. Além disto, este grupo também apresentou valores maiores de carbonilação proteica (PCO) e conteúdo de tióis (GSH) na análise do tecido cerebral, e ainda níveis menores da atividade da acetilcolinesterase (AChE). No músculo, a atividade da acetilcolinesterase foi maior no grupo do reservatório do Passauna, mostrando um resultado diferente do encontrado no cérebro. Na TABELA 5 são apresentados de maneira resumida os resultados obtidos nas análises bioquímicas realizadas nos animais de ambos os reservatórios.

**TABELA 5:** Análises bioquímicas realizadas com *O. niloticus* mantidas em tanques-redes nos dois reservatórios. Os dados expressam média  $\pm$  erro médio. Obs: LPO – Peroxidação lipídica, PCO – carbonilação proteica, GSH – conteúdo de tióis totais incluindo a glutathione reduzida, GST – glutathione-S-transferase, AChE – Acetilcolinesterase. Significância: \* -  $0,05 > p > 0,01$ , \*\* -  $0,01 > p > 0,001$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ . Os valores estão expressos em nmol/mg prot<sup>-1</sup> para LPO, PCO e GSH, em nmol.min<sup>-1</sup>.mg prot<sup>-1</sup> para AChE e em  $\mu$ mol.min<sup>-1</sup>.mg prot<sup>-1</sup> para GST e catalase.

	Análise	TR-Iraí (N=18)	TR-Passaúna (N=18)
Fígado	LPO	0,5902 $\pm$ 0,0349	0,8734 $\pm$ 0,0721(↑**)
	PCO	1,676 $\pm$ 0,211	2,625 $\pm$ 0,135(↑***)
	GSH	11,73 $\pm$ 0,9249	8,011 $\pm$ 0,8181(↓**)
	GST	0,2434 $\pm$ 0,0047	0,2658 $\pm$ 0,0067(↑**)
	Catalase	392,9 $\pm$ 12,8	947,5 $\pm$ 52,2 (↑**)
Cérebro	AChE	127,0 $\pm$ 9,131	95,63 $\pm$ 5,647(↓**)
	PCO	1,636 $\pm$ 0,200	2,635 $\pm$ 0,422(↑*)
	GSH	5,69 $\pm$ 0,8270	10,65 $\pm$ 0,7695(↑***)
Músculo	AChE	41,00 $\pm$ 2,827	57,58 $\pm$ 2,130 (↑***)

## 5. DISCUSSÃO

Atualmente, grande parte dos reservatórios da bacia do Alto Iguaçu apresenta algum grau de contaminação, principalmente aqueles que estão localizados próximos a regiões onde há ocupação humana, como é o caso dos reservatórios do Iraí e Passaúna. O reservatório do Iraí estende-se por 14,69Km<sup>2</sup> e apresenta uma vazão média de descarga de 2,5 mil litros por segundo (IAP, 2009b). A baixa profundidade média deste reservatório e o tempo de detenção da água longo (cerca de dois anos), associados à elevada carga de nutrientes e matéria orgânica proveniente dos rios contribuintes (Curralinho, Timbu e Canguiri), favorecem a eutrofização do reservatório (IAP, 2009b). Além disto, a proximidade à área urbana e a ocorrência de atividades como a mineração na cabeceira do Rio Curralinho e indústrias na bacia do rio Capivari estimulam a ocupação desordenada nas áreas próximas ao reservatório, resultando em um maior potencial impactante por liberação de esgotos nos corpos d'água (ANDREOLI *et al.*, 1999). Cabe também ressaltar o potencial impactante dos efluentes ricos em nutrientes liberados por algumas indústrias, pois apesar dos efluentes industriais próximos ao reservatório passarem por sistemas de tratamento e encontrarem-se dentro dos limites legais estabelecidos, estes sistemas de tratamento não possuem capacidade de remoção de nitrogênio e fósforo, especialmente no caso de indústrias alimentícias (XAVIER, 2005).

Já o reservatório do Passaúna é responsável pelo abastecimento de cerca de 22% da população da região metropolitana de Curitiba (RMC), produzindo em torno de 2 mil litros de água por segundo (IAP, 2009b, ANDREOLI *et al.*, 1999). Ele estende-se ao longo de uma área de 145 Km<sup>2</sup> e caracteriza-se pela compartimentalização horizontal, com uma região de transição lótico/lêntico e outra região lêntica, mais larga e profunda (IAP, 2009b). Apesar de inserida numa área de proteção ambiental, esta represa sofre um grande risco de contaminação oriunda de atividades praticadas na região próxima a barragem como a agricultura, com rotação de culturas entre batata, milho e feijão (com aplicação de fertilizantes principalmente entre junho e outubro); a agropecuária, com suinoculturas de médio-porte em Campo Magro, cujos efluentes não são adequadamente tratados; os polos industriais de Curitiba e Araucária, localizados na sub-bacia do Passaúna (onde os efluentes são tratados apenas em parte); além do potencial impacto gerado pelo

lixão da Lamenha Pequena, que fica localizado na região montante do reservatório (possível fonte intermitente de contaminação em época de chuvas)(Xavier 2005).

O uso de agroquímicos nas regiões próximas ao reservatório do Passaúna ressalta a preocupação sobre o monitoramento da contaminação com este tipo de composto químico, pois, além dos fertilizantes utilizados apresentarem potencial eutrofizante se carregados até os cursos d'água, muitos dos pesticidas utilizados na agricultura promovem diversos efeitos nocivos aos ecossistemas aquáticos expostos a eles. No cultivo de batatas, por exemplo, são utilizados no Brasil diversos tipos de agrotóxicos como a deltametrina, o glifosato, o Temik 150, ou ainda a Abamectina e o Acefato, inseticidas de classe toxicológica I e III respectivamente, que podem causar toxicidade reprodutiva, neurotoxicidade e aumento das células carcinogênicas<sup>1</sup>.

Assim como foi comentado anteriormente, no último relatório técnico realizado pelo IAP sobre o Índice de Qualidade da Água em Reservatórios, o reservatório do Passaúna foi considerado como moderadamente degradado, enquanto o reservatório do Iraí foi avaliado como criticamente degradado à poluído (IAP, 2009b). Entretanto, apesar deste relatório indicar o reservatório do Passaúna como menos impactado que o reservatório do Iraí, os resultados encontrados neste trabalho indicam uma situação diferente na avaliação dos bioindicadores, pois os animais mantidos no reservatório do Passaúna apresentaram tantas alterações morfológicas e fisiológicas quanto os animais mantidos no reservatório do Iraí, como será discutido a seguir.

O fator de condição (K) dos animais mantidos no reservatório do Passaúna foi maior do que no grupo do reservatório do Iraí. O fator K indica o grau de bem estar dos peixes em relação ao meio em que vivem, portanto, fatores de condição menores podem indicar que o ambiente apresenta características que podem afetar o desenvolvimento dos animais (FROESE, 2006). Entretanto, o desenvolvimento corporal pode ser influenciado por diversos fatores ligados à espécie, a idade, ao desenvolvimento ontogenético, ao período reprodutivo, e às características ambientais como período do ano e temperatura (CAMARA, CARAMASCHI E PETRY 2011). Como os animais utilizados em cada grupo pertenciam à mesma espécie e apresentavam tamanhos semelhantes no início do experimento, é possível supor que a variação encontrada entre os fatores K médios de cada grupo deva-se

---

<sup>1</sup>fonte: [www.zun.com.br/agrotoxicos-mais-usados-no-brasil/ewww.rel-uita.org/agricultura/agrotoxicos/jogador\\_dois\\_times.htm](http://www.zun.com.br/agrotoxicos-mais-usados-no-brasil/ewww.rel-uita.org/agricultura/agrotoxicos/jogador_dois_times.htm) - acesso em 15/12/2012

principalmente ao ambiente. Embora o fator K das tilápias do reservatório do Passaúna tenha sido maior que o das tilápias do Iraí, estas cresceram mais que aquelas, mostrando que as tilápias do grupo TR-Iraí incrementaram principalmente o comprimento corporal, enquanto as tilápias do grupo TR-Passaúna incrementaram o peso corporal.

Além do fator de condição, também foi utilizada a análise histopatológica de órgãos-alvos para o estudo da condição de saúde das tilápias de cada grupo. O fígado é um importante tecido alvo de diversos contaminantes ambientais, o que torna a avaliação da ocorrência de lesões neste órgão uma importante ferramenta tanto de avaliação dos efeitos de xenobióticos quanto das respostas de defesa adotadas pelos animais (VAN DER OOST, BEYER, VERMEULEN 2003). Em ambos os reservatórios envolvidos neste trabalho, foram encontradas diversas lesões e alterações nos fígados dos animais avaliados, como necroses, infiltrações leucocitárias, congestão vascular, hipertrofias citoplasmática e nuclear e presença de parasitas (possivelmente da espécie *Sphaerothecum destruens*). No entanto, o grupo TR-Passaúna apresentou algumas alterações de caráter mais severo do que o grupo TR-Iraí, com focos necróticos maiores, presença de mais parasitas, maior degeneração do tecido pancreático e hipertrofia associada a degeneração hidrópica dos hepatócitos (VAN DYK *et al* 2012, WOLF e WOLFE, 2005). Lesões no parênquima hepático já foram anteriormente associadas a exposição à poluição aquática de origem urbana e rural (ABDEL-MONEIM, AL-KAHTANI e ELMENSHAWY, 2012; COSTA *et al*, 2011; NOGUEIRA *et al*, 2010; AYAS *et al*, 2007), à contaminação por pesticidas baseados em glifosato e endosulfan (SHIOGIRI *et al*, 2012; COIMBRA *et al*, 2007) e metais como zinco, cádmio e cobre (VAN DYK *et al*, 2007, FIGUEIREDO-FERNANDEZ *et al*, 2007, KAOUD e EL-DAHSHAN, 2010).

Também foi realizada a contagem do número de centros de melanomacrófagos (CMMs) presentes no fígado dos animais expostos. Os CMMs são agrupamentos de macrófagos que contêm pigmentos e que podem variar em tamanho e número em resposta a condições ambientais estressoras (AGIUS e ROBERTS, 2003). Neste trabalho, foi encontrado um número significativamente maior de CMMs presentes nos cortes histológicos de fígado no grupo TR-Iraí. A função dos CMMs ainda não é totalmente conhecida, mas diversas associações já foram descritas na literatura como apresentação de antígenos, captura de metais, captura de produtos de degradação celular e ainda sequestro e detoxificação de

substâncias endógenas e exógenas potencialmente tóxicas (AGIUS e ROBERTS, 2003). Desta maneira, os resultados encontrados neste biomarcador podem indicar um aumento nos CMMs do grupo TR-Iraí induzido pelos efeitos da poluição do reservatório ou, ainda, uma imunossupressão no grupo do TR-Passaúna, com redução da atividade fagocítica dos CMMs. O aumento no tamanho e número de CMMs também foi encontrado em estudos de exposição a Endosulfan (COIMBRA *et al*, 2007), metais (SURESH, 2009) e em ambientes aquáticos poluídos (ABDEL-MONEIM, AL-KAHTANI e ELMENSHAWY, 2012).

A ocorrência das extensas áreas necróticas encontradas no grupo TR-Passaúna pode estar relacionada a eventos celulares como a carbonilação proteica e a peroxidação lipídica nos hepatócitos, pois ambas apresentaram níveis mais altos em relação ao grupo TR-Iraí na avaliação bioquímica do fígado homogenizado. A peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas são consequências importantes do estresse oxidativo. Na LPO várias reações bioquímicas deletérias podem surgir a partir de poucos radicais através de uma reação em cadeia, e na carbonilação de proteínas ocorre a formação de grupos carbonila (como grupos aldeído ou cetona) que alteram a conformação proteica e tendem a torná-las mais hidrofóbicas e resistentes à hidrólise (LEVINE *et al*. 1994; e QUINLAN e GUTTERIDGE, 2000). Deste modo, o aumento da peroxidação lipídica e da carbonilação de proteínas pode resultar em diversos danos às membranas celulares, enzimas, DNA e diversas outras biomoléculas importantes na célula (VAN DER OOST, BEYER, VERMEULEN, 2003). Numerosos trabalhos têm relacionado o aumento da LPO e da PCO em peixes aos efeitos da exposição à uma variedade de substâncias tóxicas como microcistinas (PRIETO *et al*, 2006), metais como cádmio e cobre (ROMEO *et al*, 2000), pesticidas (CAVALHEIRO DE MENEZES *et al*, 2011, PARVEZA e RAISUDDINB, 2005), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - PAHs (ALMROTH *et al*, 2008), ou também a outros contaminantes mais comuns em rios poluídos pela atividade antrópica (FERREIRA *et al* 2005).

Os altos índices de danos oxidativos à proteínas e lipídeos encontrados no grupo TR-Passaúna em relação ao grupo TR-Iraí demonstram claramente uma falha no sistema antioxidante nestes animais. Este quadro é evidenciado pelos níveis baixos de GSH encontrados neste grupo, os quais são inferiores aos valores encontrados no grupo TR-Iraí. A GSH é um tripeptídeo composto de g-glutamina, cisteína e glicina que durante a fase II de detoxificação de xenobióticos é conjugada

com diversos componentes eletrofílicos, principalmente pela via da GST (BOELSTERLI, 2007). Visto que o grupo que apresentou os níveis mais altos de GSH foi o mesmo que teve índices menores de PCO e LPO, isto mostra que a GSH pode estar exercendo, através da eficiente neutralização das espécies reativas, um papel protetor para os animais do grupo do reservatório do Iraí. A redução da GSH no grupo Passaúna, por sua vez, pode estar sendo causada pelo aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROS), que estariam consumindo uma grande quantidade de GSH. Além disto, quando há um aumento no custo energético para manter o sistema antioxidante durante o estresse oxidativo, o próprio processo de geração de energia também reduz os estoques de moléculas redutoras intracelulares (VAN DER OOST, BEYER, VERMEULEN 2003).

A hipótese de que os níveis de GSH no grupo Passaúna estariam mais baixos devido ao aumento do metabolismo de xenobióticos é reforçada pela maior atividade da GST em relação ao outro grupo avaliado, uma vez que esta enzima é uma das responsáveis pela conjugação da GSH com compostos eletrofílicos (ou metabólitos da fase I) (BOELSTERLI, 2007). O aumento na atividade da GST pode ocorrer tanto em resposta direta à necessidade de neutralização de EROS quanto pela via do receptor Ah, (VAN DER OOST, BEYER, VERMEULEN, 2003) um fator de transcrição citosólico que já foi descrito como mediador da resposta tóxica de diversos contaminantes presentes em agroquímicos (BOELSTERLI, 2007). Além disto, já foram descritos diversos casos de induções na atividade da GST relacionados à exposição à agente químicos como PAHs (SHAILAJA e D'SILVA, 2003), Benzo[a]Pireno (VIEIRA *et al*, 2008), herbicidas (PEIXOTO *et al*, 2006), metais (ATLI e CANLI, 2010), além estudos realizados também em rios contaminados (FRANCO *et al*, 2010).

Em geral a atividade da GST é benéfica ao organismo, pois ela neutraliza espécies reativas conjugando-as com a GSH. Entretanto, o aumento da atividade da GST no grupo Passaúna não foi suficiente para manter o equilíbrio óxido redutor nestas células, como ficou evidenciado no aumento da peroxidação de lipídeos e na carbonilação de proteínas, os quais mostraram que a geração de EROS é maior que a capacidade de resposta antioxidante nestas células. Além disto, a própria GST possui potencial gerador de espécies reativas ao ativar metabolicamente xenobióticos halogenados (BOELSTERLI, 2007), o que poderia ser mais um indicativo para a necessidade de se investigar a presença de contaminantes de origem agroquímica no reservatório do Passaúna.

A intensa formação de espécies reativas poderia ser uma das causas para a indução da atividade da catalase encontrada no grupo TR-Passaúna. A catalase, que em geral está localizada nos peroxissomos, é uma enzima do sistema antioxidante que metaboliza o peróxido de hidrogênio (o qual é altamente reativo) em oxigênio molecular e água (VAN DER OOST, BEYER, VERMEULEN 2003). Possivelmente, as espécies reativas geradas em excesso poderiam estar ativando a enzima superóxido-dismutase, a qual produziria o peróxido de hidrogênio que induziria a catalase (SMART e HODGSON, 2008). A indução da atividade da catalase também já foi anteriormente descrita em *O. niloticus* como resposta a exposição ao cádmio e zinco (ATLI e CANLI, 2007), fenantreno (WENJU *et al*, 2009) e poluentes organo persistentes (LIU *et al*, 2007).

Além do sistema antioxidante celular, as atividades neurológicas e comportamentais de animais também podem ser extremamente sensíveis a contaminação ambiental (FLAMMARION e GARRIC, 2002). Na análise de biomarcadores cerebrais, o grupo TR-Passaúna apresentou indicativos relevantes de efeitos nocivos de xenobióticos no cérebro, com níveis maiores de GSH que, no entanto, não impediram os altos níveis de carbonilação proteica, além de níveis mais baixos na atividade da AChE em relação ao grupo TR-Iraí. Por outro lado, a atividade da AChE muscular foi significativamente menor no reservatório do Iraí. A AChE cataliza a hidrólise do neurotransmissor acetil-colina (ACh) restante no espaço sináptico em colina e acetato, prevenindo a super-estimulação do neurônio e garantindo o funcionamento normal do sistema sensorial e motor. A inibição da AChE já foi anteriormente documentada em tilápias em estudos de impacto da agricultura próxima à rios (LINDE-ARIAS *et al*, 2008) e também em estudos em laboratório com exposição à inseticidas e pesticidas (GUIMARÃES *et al*, 2007, CHANDRASEKARA e PATHIRATNE, 2007, PESSOA *et al*, 2011, BARBIERI E FERREIRA, 2011).

Em estudos de campo, diversos fatores podem influenciar a atividade da AChE, dificultando assim a identificação das causas acerca das alterações na atividade desta enzima (VAN DER OOST, BEYER, VERMEULEN, 2003). A diferença entre os resultados obtidos na atividade da AChE no cérebro e no músculo pode ser decorrente da presença de combinações distintas de xenobióticos em cada reservatório, ou ainda a fatores fisiológicos, como foi demonstrado por Flammarion

ao descrever que a atividade da AChE tende a ser menor em peixes maiores (FLAMMARION *et al*, 2002).

Outro efeito tóxico bastante importante no estudo de contaminantes ambientais é a ação desreguladora endócrina exercida por muitos xenobióticos, os quais alteram a função hormonal endógena dos organismos, afetando o comportamento e reprodução destes (MLANDO *et al*, 2009). A influência destes químicos pode ocorrer em múltiplas partes do sistema reprodutivo, abrangendo desde efeitos sobre a produção e secreção de hormônios no hipotálamo, na glândula pituitária e gônadas, até alterações na maturação e morfologia das gônadas (VAN DER OOST, BEYER, VERMEULEN, 2003). Neste trabalho, foi analisada a morfologia das gônadas dos peixes de ambos os grupos em busca de informações sobre a possível exposição a desreguladores endócrinos. Os resultados obtidos não indicaram interrupção no padrão normal de maturação das gônadas e, além disto, em ambos os grupos foram encontradas apenas algumas poucas ocorrências de alterações como infiltrações leucocitárias, presença de parasitas (possivelmente da espécie *Sphaerothecum destruens*), folículos atrésicos, deposição semelhante a vitelo e ocorrência de células neoplásicas nos testículos. Lesões espontâneas nas gônadas podem ocorrer randomicamente sob condições normais (ROSSTEUSCHER *et al.*, 2008), no entanto, alterações como o aumento na ocorrência de folículos atrésicos e retração citoplasmática já foram associadas a exposição à contaminantes em estações próximas a zonas de atividade agricultora (LOUIS, BEN-ATTIA e BEN-HASSINE, 2009) e a misturas de poluentes organo-persistentes (KRAUGERUD *et al*, 2012). Além disto, a presença de danos nos túbulos seminíferos também já foi descrita em estudos com exposição a DDT (MLAMBO *et al*, 2009), ao 17 $\beta$ -estradiol (MONCAUT, LO NOSTRO e MAGGESE, 2003) e a metais pesados (PIETERSE, 2004).

Em estudos recentes do grupo de Toxicologia Celular da UFPR, foi detectada a presença de desreguladores endócrinos nas mesmas tilápias avaliadas neste trabalho. Como parte de outro estudo dos reservatórios, foi observado por Yamamoto (2012) que machos de *O. niloticus* dos dois reservatórios (Iraí e Passaúna) expressaram vitelogenina em concentrações capazes de serem identificadas por testes bioquímicos. Deste modo, fica ressaltado o potencial tóxico de desreguladores endócrinos presentes nestes reservatórios, pois embora as alterações encontradas nas gônadas tenham sido pouco expressivas, elas indicam que em longo prazo a alteração da homeostase endócrina pode evoluir do nível



bioquímico para o nível histológico e, potencialmente, afetar a capacidade reprodutiva destes animais.

Assim como o fígado e as gônadas, as brânquias também são órgãos extremamente vulneráveis a danos causados por xenobióticos, pois estão em contato direto com a água do meio e são ricamente vascularizadas, o que as torna sensíveis o bastante para indicar até mesmo efeitos iniciais de baixas concentrações de poluentes (PAWERT, MULLER, TRIEBSKORN 1998). No presente trabalho, foram encontradas mais alterações nas brânquias no grupo TR-Iraí que no grupo TR-Passaúna, contudo, este último grupo também apresentou uma frequência considerável de lesões. Alterações no tecido branquial como proliferação celular, hipertrofia, hiperplasia, fusão lamelar e aneurismas já foram associadas à exposição a diferentes contaminantes como cobre (MAZON, CERQUEIRA e FERNANDEZ, 2002), cádmio (WONG e WONG, 2000), metais traço (PANDEY *et al*, 2008), inseticidas como o profenofos (VENKATESWARA *et al*, 2003) e água poluída tratada (BIAGINIDAVID e FONTANETTI, 2009).

Por fim, os dados encontrados no presente trabalho mostram que ambos os reservatórios avaliados encontram-se impactados por contaminantes com elevado potencial tóxico. No entanto, contrariamente ao esperado em uma comparação entre reservatórios avaliados como criticamente e moderadamente degradados, o reservatório do Passaúna (moderadamente degradado) apresenta um nível tão tóxico para os peixes quanto o reservatório do Iraí (criticamente degradado). Os resultados ressaltam a importância de uma investigação mais completa sobre os contaminantes que estão afetando a qualidade de água dos reservatórios da região metropolitana de Curitiba, bem como destaca o potencial do biomonitoramento como ferramenta complementar na avaliação ambiental e monitoramento da qualidade de água.

## **6. CONCLUSÕES**

Os resultados encontrados neste trabalho mostraram que ambos os reservatórios estudados encontram-se impactados por contaminantes com potencial tóxico e, além disto, os animais mantidos no reservatório do Passaúna apresentaram tantas alterações biológicas quanto os animais mantidos no reservatório do Iraí, apesar deste ser classificado oficialmente como mais impactado que o reservatório do Passaúna. Deste modo, o presente estudo ressaltou a importância da inclusão do biomonitoramento com o uso de biomarcadores e da análise dos efeitos de diferentes classes de contaminantes em estudos de avaliação da qualidade da água de reservatórios de abastecimento público. Abre-se, portanto, uma discussão quanto à real qualidade de água dos reservatórios, sugerindo novos estudos e padrões de análise para o controle não só da qualidade da água, mas também dos impactos que margeiam estes importantes corpos d'água.

## CAPÍTULO II

### AVALIAÇÃO DA SAÚDE DA ICTIOFAUNA NO ESTUDO DA QUALIDADE DA ÁGUA DO RESERVATÓRIO DOIRAÍ - REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA

#### RESUMO

Os efeitos da poluição química na água impactam fortemente os ecossistemas aquáticos e as relações ecológicas que se desenvolvem nestes ambientes, gerando diversos riscos e consequências negativas para o equilíbrio das comunidades expostas aos químicos, incluindo até mesmo a redução significativa de populações mais sensíveis à contaminação. Buscando compreender os efeitos da poluição em peixes distintos de um reservatório impactado, o presente estudo foi realizado utilizando-se biomarcadores de citotoxicidade para avaliar diferenças de respostas à poluição aquática em peixes expostos cronicamente no reservatório Iraí (Curitiba, PR), o qual foi avaliado pelo Instituto Ambiental do Paraná como criticamente degradado. Para isto, foram coletados indivíduos do gênero *Astyanax sp*, e das espécies *Tilapia rendalli* e *Hoplias malabaricus* naturais do reservatório do Iraí. Os animais coletados foram processados e analisados utilizando-se biomarcadores morfológicos e bioquímicos de contaminação ambiental. Na análise morfológica das brânquias foram encontradas diversas lesões nos peixes expostos cronicamente no reservatório do Iraí, principalmente no grupo *Astyanax sp*, sugerindo uma maior sensibilidade deste grupo à exposição a contaminantes por via hídrica. Da mesma forma, na análise morfológica de fígado foram encontradas diversas alterações e lesões em todos os grupos, porém neste biomarcador a espécie *H. malabaricus* mostrou-se ligeiramente mais afetada, indicando que esta espécie é mais sensível à exposição de contaminantes pela via trófica. Além disto, biomarcadores bioquímicos indicaram efeitos neurotóxicos de inibição da AChE muscular em todos os grupos, bem como alterações relacionados à capacidade de detoxificação e controle do estado óxido-redutor celular no fígado, mostrando que estes animais estão expostos à xenobióticos capazes de causar injúrias celulares e fisiológicas significativas. Deste modo, o presente estudo mostrou que a sensibilidade à poluição aquática em peixes varia não somente em relação a espécie, mas também em relação ao órgão analisado e a via principal de exposição, o que ressalta a importância do conhecimento sobre as variações de sensibilidade em peixes como uma ferramenta fundamental na compreensão dos efeitos dos impactos ambientais na ictiofauna, além de também auxiliar no planejamento de estudos de monitoramento e estratégias de conservação e manejo dos ecossistemas.

Palavras-chave: Reservatórios, poluição, biomarcadores, sensibilidade em peixes, vias de exposição.

## 1. INTRODUÇÃO

Muitos ecossistemas aquáticos são continuamente expostos a substâncias químicas de origem antrópica, entretanto, vários efeitos deletérios destas substâncias podem ser detectadas apenas após longos períodos de exposição, quando o processo destrutivo é demasiado avançado. Diante disto, é crescente a preocupação pela busca de protocolos de avaliação ambiental que permitam um diagnóstico precoce dos impactos, como por exemplo, através da utilização de biomarcadores em peixes, os quais podem atuar como sentinelas biológicos da poluição aquática (VAN DER OOST, BEYER, VERMEULEN, 2003). Entretanto, diferentes espécies podem apresentar variações interespecíficas nas respostas biomarcadoras, o que faz do conhecimento sobre as variações de sensibilidade em peixes, uma ferramenta fundamental na compreensão dos efeitos dos impactos ambientais na ictiofauna em diferentes ambientes, além de também auxiliar no planejamento das estratégias de conservação e manejo dos ecossistemas aquáticos (ELLESAT *et al.* 2011). Consequentemente, a compreensão das diferenças de sensibilidade entre as espécies também tem grande importância na escolha de bioindicadores para avaliação de risco ambiental, pois espécies mais resistentes podem induzir uma subestimativa dos efeitos de contaminantes presentes em ambientes impactados, bem como não representar de forma significativa os possíveis desdobramentos ecológicos decorrentes da poluição ambiental (WIRGIN e WALDMAN, 2004).

Inserido neste contexto, o objetivo desta parte do trabalho foi avaliar diferenças de sensibilidade à poluição aquática em três grupos de peixes (tilápias, lambaris e traíras) residentes no reservatório do Iraí, um reservatório de água voltado para o abastecimento público que foi classificado como criticamente impactado pelo Instituto Ambiental do Paraná - IAP.

### 1.1. Bioindicadores Utilizados

O reservatório do Iraí apresenta uma ictiofauna caracterizada por um número relativamente pequeno de espécies e um elevado grau de endemismo, com um padrão semelhante ao do rio Iguaçu. Em trabalhos de caracterização da ictiofauna presente no reservatório foram encontradas 10 famílias e 21 espécies distintas, incluindo oito espécies endêmicas do rio Iguaçu, seis morfotipos ainda não descritos

e duas espécies exóticas (OLIVEIRA *et al.*, 2008; ABILHOA *et al.*, 2003). De acordo com Oliveira *et al.* (2008) as espécies presentes no reservatório correspondem a cerca de 50% das espécies encontradas na região do alto Rio Iguaçu e a 25% do total de espécies catalogadas para a bacia.

No presente trabalho, buscou-se realizar um estudo comparativo de respostas biomarcadoras com espécies distintas de peixes, de modo a atingir diferentes níveis tróficos e, ainda, avaliar variações de resposta entre uma espécie endêmica e uma espécie introduzida na fauna local. Para tanto, dentre as espécies existentes no reservatório, foram escolhidos como bioindicadores três grupos de peixes popularmente conhecidos como lambaris, tilápias e traíras, os quais são caracterizados a seguir.

### **LAMBARIS**

Os lambaris pertencem ao gênero *Astyanax* (Baird e Girard, 1854 – FIGURA 1A), família Characidae, e são originários das Américas do Sul e Central, sendo comuns em todo o Brasil (REIS, KULLANDER e FERRARIS, 2003). É um grupo muito diversificado, com mais de cem espécies já descritas e várias sendo descritas a cada ano (ZANATA e CAMELIER, 2009; GARAVELLO e SAMPAIO, 2010). Estes animais apresentam características morfológicas e comportamentais bastante variadas, mas assemelham-se pelo pequeno porte, com tamanho médio entre 10 e 20 centímetros de comprimento, corpo prateado alongado e nadadeiras coloridas, cujos tons variam entre as espécies, além de um pré-maxilar com duas séries de dentes (série interna com 5 dentes) e linha lateral completa (BRITSKI, 1972). São onívoros e alimentam-se de frutos, sementes, pequenos crustáceos, insetos, detritos e ovos de peixes maiores. Constituem ainda a base da alimentação de diversos peixes predadores e apresentam também um papel relevante na pesca (PRIOLI *et al.*, 2002). A atividade reprodutiva ocorre principalmente nos períodos mais quentes do ano, i.e. primavera e verão, com diferentes táticas de desova que variam de acordo com a espécie e o ambiente em que vivem (SILVA *et al.*, 2010).

Estes peixes de clima subtropical desenvolvem-se bem em águas com temperatura entre 20 e 28°C e podem ser encontrados em diversos rios, lagoas, córregos e represas do Brasil, apresentando altos níveis de endemismo em algumas regiões, como a bacia do Rio Iguaçu (GARAVELLO e SAMPAIO, 2010; PRIOLI *et al.*

2002). Em estudos anteriores realizados no reservatório do Iraí, foram encontradas algumas espécies de lambaris como *Astyanax aff. fasciatus*, *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000) e outros quatro morfotipos endêmicos da bacia do Rio Iguaçu ainda não descritos (*Astyanax sp. B*; *Astyanax sp. C*; *Astyanax sp. D* e *Astyanax sp. E*) (SILVA *et al*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

## **TILÁPIAS**

As Tilápias constituem várias espécies de peixes ciclídeos de água doce pertencentes à família Cichlidae e sub-família Pseudocrenilabrinae, distribuídas em três gêneros, *Oreochromis*, *Sarotherodon* e *Tilapia* (Smith, 1840). Nativos da África e Ásia Menor, estes peixes foram introduzidos nas Américas do Sul e do Norte e hoje são comuns em todo o Brasil, principalmente no sul e sudeste (OSTINI, 2002). São espécies oportunistas, com grande capacidade de adaptação aos ambientes lênticos, suportando variações de temperatura, salinidade, presença de amônia e tolerando baixos teores de oxigênio dissolvido (EL-SAYED, 2006). De modo geral, o corpo é comprimido lateralmente e apresenta uma longa nadadeira dorsal, cuja porção anterior contém vários espinhos, assim como as nadadeiras pélvica e anal. Geralmente há largas listras verticais ao lado do corpo, que podem ser mais ou menos aparentes dependendo da espécie. (POPMA e MASSER, 1999). A alimentação pode variar dependendo da espécie: podem ser onívoras, herbívoras, fitoplanctófagas (IBAMA – PNPDA), ou ainda filtradoras, uma vez que secretam bastante muco nas brânquias, onde fica aderido o plâncton presente na água (POPMA e MASSER, 1999).

Todas as espécies incluídas no grupo das tilápias são construtoras de ninhos e possuem hábito de cuidado parental da ninhada, sendo o comportamento reprodutivo uma das características mais relevantes na diferenciação entre os três gêneros. No gênero *Tilapia*, a desova é realizada em ninhos e a fertilização é externa, com ambos os pais apresentando cuidado parental. Os gêneros *Oreochromis* e *Sarotherodon*, por outro lado, são característicos por guardar a ninhada na boca após a fertilização no ninho, mas no primeiro gênero apenas as fêmeas apresentam cuidado parental, enquanto no segundo tanto o macho quanto a fêmea apresentam este comportamento (EL-SAYED, 2006).

Em estudos de caracterização da ictiofauna no reservatório do Iraí foi identificada a presença da espécie *Tilapia rendalli* (FIGURA 1B) (OLIVEIRA *et al*,

2008), a qual possui origem africana e foi introduzida no Brasil por volta da década de 50 (WELCOMME, 1988).

## **TRAÍRAS**

As traíras (*Hoplias malabaricus* - Bloch, 1794 – FIGURA 1C) são peixes piscívoros pertencentes à família Erythrinidae, que distribuem-se entre as Américas Central e do Sul (REIS, KULLANDER e FERRARIS, 2003, FROESE e PAULI, 2011). Muito populares no Brasil, podem ocorrer em diversos tipos de ambientes, desde rios a lagoas de águas turvas, principalmente em ambientes lânticos, com condições de clima tropical e temperaturas entre 20° e 26°C e pH de 6.0 - 8.0 (BAENSCH e RIEHL, 1985, RIEDE, 2004 *apud* FROESE e PAULI, 2011).

Esta espécie apresenta corpo alongado e cilíndrico, de coloração marrom dourado, nadadeira caudal arredondada, cabeça alargada e boca ampla, com a mandíbula maior que a maxila e fortes dentes cônicos de tamanhos diversos. Podem atingir tamanho médio entre 40 a 60 cm e os indivíduos maiores podem exceder dois quilogramas (BRITSKI *et al* 2007). São predadores bentopelágicos de hábito mais noturno, se escondem em meio a vegetação durante o dia e alimentam-se principalmente durante o anoitecer. Os adultos alimentam-se de outros peixes enquanto os juvenis alimentam-se de plâncton, pequenos crustáceos, larvas de insetos e pequenos invertebrados (CARVALHO, FERNANDES e MOREIRA, 2002). A desova nesta espécie é feita de forma parcelada (adaptação para evitar a competição por recursos durante o período reprodutivo) e ocorre principalmente nos meses de setembro e outubro, podendo estender-se até fevereiro em alguns locais (BARBIERI *et al.* 1989). A deposição dos ovos é feita em ninhos construídos em pequenas depressões em meio à vegetação submersa, onde o macho permanece cuidando dos ovos mesmo após a eclosão destes (PRADO *et al.* 2006).



**FIGURA 1:** Exemplos de espécies pertencentes aos grupos popularmente conhecidos como lambaris, tilápias e traíras. A – *Astyanax bimaculatus* (CASTRO e CASSATI, 1997); B – *Tilapia rendalli* (SEEGERS, 1996); C – *Hoplias malabaricus* (Fonte: <http://www.amazon-exotic-import.de>, Acesso em 20/12/12);

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

O objetivo desta etapa do trabalho foi avaliar comparativamente três grupos de peixes (*Tilapia rendalli*, *Astyanax sp.* e *Hoplias malabaricus*) expostos cronicamente no reservatório do Iraí, buscando diferenças de sensibilidade de respostas biomarcadoras e possíveis relações com níveis tróficos.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar a morfologia histológica de gônadas e fígado;
- Avaliar a arquitetura dos arcos branquiais através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- Avaliar a condição de estresse oxidativo em fígado através de análises bioquímicas;
- Avaliar a neurotoxicidade através da atividade da enzima acetilcolinesterase em músculo e cérebro;



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

As espécies de peixes escolhidas foram coletadas no reservatório do Iraí em janeiro de 2011, utilizando-se redes de espera e tarrafas com malhagens distintas. Também foram considerados três grupos de tilápias, lambaris e traíras coletadas em locais considerados não impactados, os quais serviriam como área de referência neste estudo. O grupo de tilápias foi proveniente da estação de Piscicultura Panamá localizada no município de Paulo Lopes - SC, enquanto os grupos de lambaris e traíras foram coletados na Piscicultura Águas Verdes localizada no município de Araucária - PR.

Durante as coletas, os animais foram anestesiados com benzocaína 0,05% e sacrificados através de secção vertebral. Foram mensurados o comprimento e o peso de cada um dos indivíduos e posteriormente foram coletados fígado, brânquias, gônadas, cérebro e músculo, os quais foram em parte armazenados a -80°C para análises bioquímicas enquanto outra parte (partes do fígado, gônadas e brânquias) foram fixados e processados utilizando protocolos padrões de histologia do Laboratório de Toxicologia Celular da UFPR.

Nas análises bioquímicas foram medidas no fígado as concentrações de tióis totais incluindo a glutathiona reduzida (GSH), o nível de peroxidação lipídica (LPO) e as atividades enzimáticas da glutathiona-S-transferase (GST) e da catalase. No cérebro foram medidas as concentrações de tióis totais incluindo a glutathiona reduzida (GSH) e a atividade da acetilcolinesterase (AChE). No músculo foi medida a atividade da AChE. Também foram analisados danos teciduais através de microscopia eletrônica de varredura em brânquias e microscopia de luz em fígado e gônadas. Todo o procedimento experimental realizado foi executado conforme as metodologias já descritas no Capítulo I.

As amostras de cada grupo obtido no reservatório do Iraí foram comparadas com amostras dos respectivos grupos referência para cada espécie utilizando-se os mesmos testes estatísticos descritos no capítulo anterior.

#### 4. RESULTADOS

Foram coletados ao todo sessenta e seis indivíduos residentes no reservatório do Iraí, divididos em três grupos, sendo 26 exemplares de *Astyanax sp.*, 25 de *Tilapia rendalli* e 15 de *Hoplias malabaricus*. Nos grupos referência foram coletados 45 exemplares de *Astyanax sp.* (os quais foram agrupados em *pools* de três animais nas análises posteriores), 10 de *H. malabaricus* e 18 de *O. niloticus*. Na TABELA 1 estão resumidas as informações sobre peso, comprimento total médio e comprimento padrão encontrados em cada grupo.

**TABELA 1:** Número de indivíduos coletados no reservatório do Iraí. CT = Comprimento total, CP = comprimento padrão, Ref: grupos referência.

Grupo	Nº indivíduos	Peso Total (grama)	CT (cm)	CP (cm)
<i>Astyanax sp.</i>	26	22,69 ± 1,16	11,811 ± 0,106	9,36 ± 0,45
<i>Tilapia rendalli</i>	25	210,47 ± 21,13	22,083 ± 0,910	17,82 ± 2,89
<i>Hoplias malabaricus</i>	15	1084,37 ± 63,94	45,407 ± 0,787	38,35 ± 2,41
Ref. <i>Astyanax sp.</i>	45	5,94 ± 0,87	7,38 ± 0,46	6,18 ± 0,36
Ref. <i>O. niloticus</i>	18	154,07 ± 48,63	19,3056 ± 2,08	15,78 ± 1,78
Ref. <i>H. malabaricus</i>	10	349,82 ± 63,29	30,35 ± 2,05	28,60 ± 3,24

\*os valores expressam médias ± erro médio.

##### 4.1. ULTRAESTRUTURA DAS BRÂNQUIAS

As brânquias analisadas apresentaram-se organizadas em quatro arcos branquiais de cada lado do corpo, com cada arco contendo duas fileiras de lamelas primárias, que por sua vez sustentam as lamelas secundárias onde ocorre a respiração. O epitélio branquial na lamela primária é constituído por células pavimentosas, células secretoras de muco e células de cloreto, estas geralmente localizadas na base da lamela secundária. A lamela secundária possui o epitélio formado por uma camada única de células pavimentosas, apoiada na membrana basal que revestem as células pilares, cujos prolongamentos delimitam o espaço por onde circula o sangue (WILSON E LAURANT, 2002).

Foram encontradas diversas alterações morfológicas nas brânquias, as quais estão expressas em frequências relativas na TABELA 2.

**TABELA 2** – Frequências relativas do número de indivíduos que apresentaram alterações histopatológicas nas brânquias. TRF – Grupo referência tilápias, TI – Grupo *T. rendalli* Iraí, ARF – Grupo *Astyanax sp.* referência, AI – Grupo *Astyanax sp.* Iraí, HRF – Grupo *H. malabaricus* referência, HI – Grupo *H. malabaricus* Iraí. (Obs: A frequência relativa foi calculada dividindo-se o número de amostras com ocorrência da lesão pelo número total de amostras e ao final os números foram expressos em percentuais).

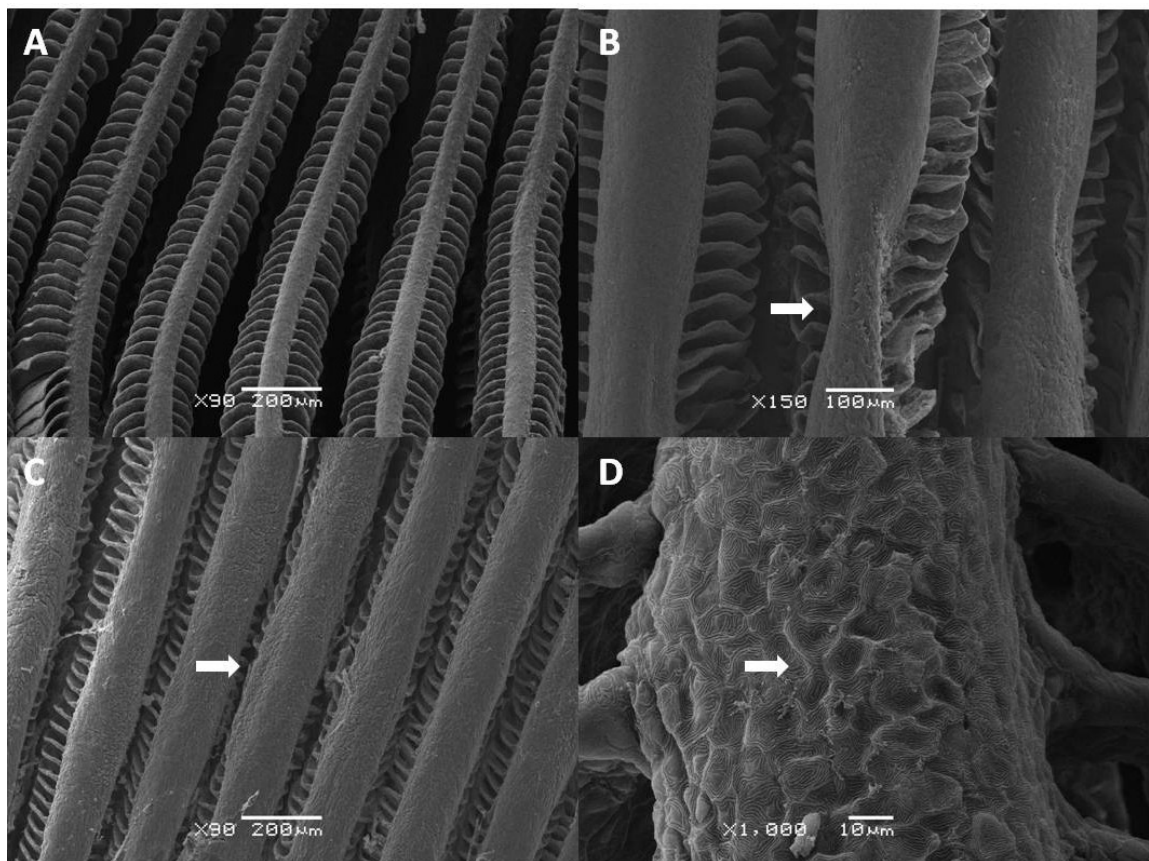
Grupos	(n)	Frequências relativas (%)										
		Aneurisma	Hiperplasia	Hipertrofia	Proliferação Celular	Alt. epiteliais	Morte Celular	Alt. estruturais	Fusão Lamelar	Atrofia	Parasitas	Tumores
TRF	7	0	29	71	29	57	14	0	0	14	14	14
TI	12	8	75	50	50	83	50	25	42	17	8	25
ARF	10	0	0	30	0	10	0	0	0	0	0	0
AI	12	92	92	83	50	100	100	42	83	33	17	25
HRF	10	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
HI	10	0	10	40	0	10	10	10	10	0	0	0
		Total de indivíduos do grupo (n)										

No grupo *Hoplias malabaricus* foi encontrada a menor frequência de lesões e alterações se comparado com os outros grupos considerados neste estudo, com ocorrência apenas de lesões não-progressivas de baixa frequência como hipertrofias, alterações epiteliais e estruturais (Figuras 2B-D), morte celular e fusão lamelar. O grupo referência apresentou apenas a alteração hipertrofia numa frequência de 25% do encontrado no grupo estudado. As lesões e alterações encontradas para este grupo estão resumidas na TABELA 2 e ilustradas na FIGURA 2.

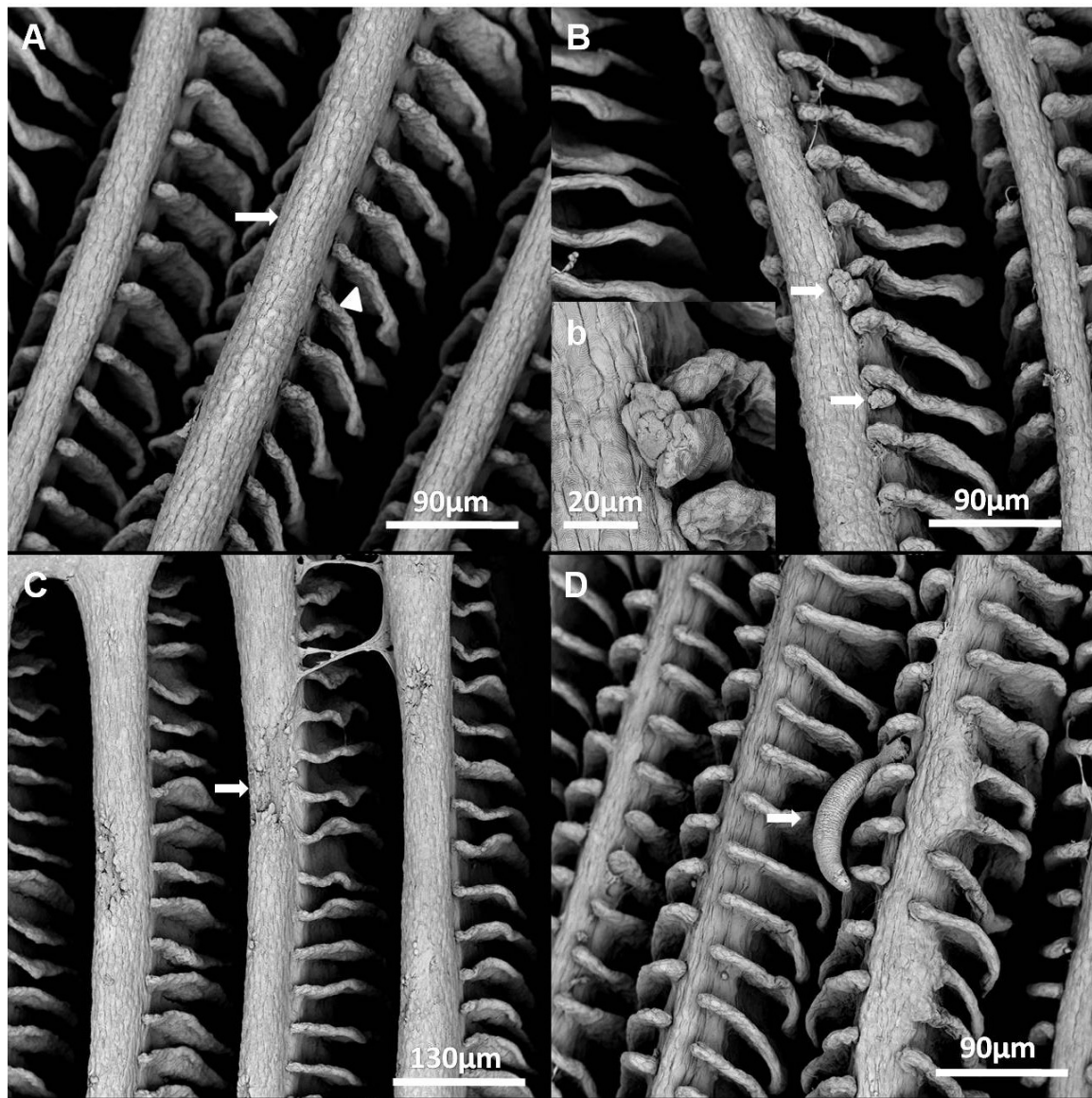
No grupo referência das tilápias também foram observadas muitas alterações e danos, inclusive algumas em grau maior que no grupo proveniente do Iraí, como é o caso das hipertrofias e maior ocorrência de parasitos (TABELA 2). As alterações e danos encontrados nas tilápias provenientes do reservatório do Iraí são ilustrados na FIGURA 3, incluindo alterações celulares com aparência neoplásica, perda tecidual com morte celular em células epiteliais na lamela primária, alterações no epitélio, hipertrofias nas lamelas secundárias e presença de parasitas (possivelmente da espécie *Sphaerothecum destruens*). Na FIGURA 3A pode ser visualizado o padrão regular esperado para este tecido, com lamelas primárias de onde partem lamelas secundárias bem definidas.

O grupo *Astyanax sp.*-Iraí, por sua vez, foi o que apresentou a maior diversidade de lesões e alterações. Neste caso o grupo referência apresentou uma menor frequência de danos, no entanto as hipertrofias e alterações epiteliais também foram registradas neste grupo. As lesões e alterações mais importantes

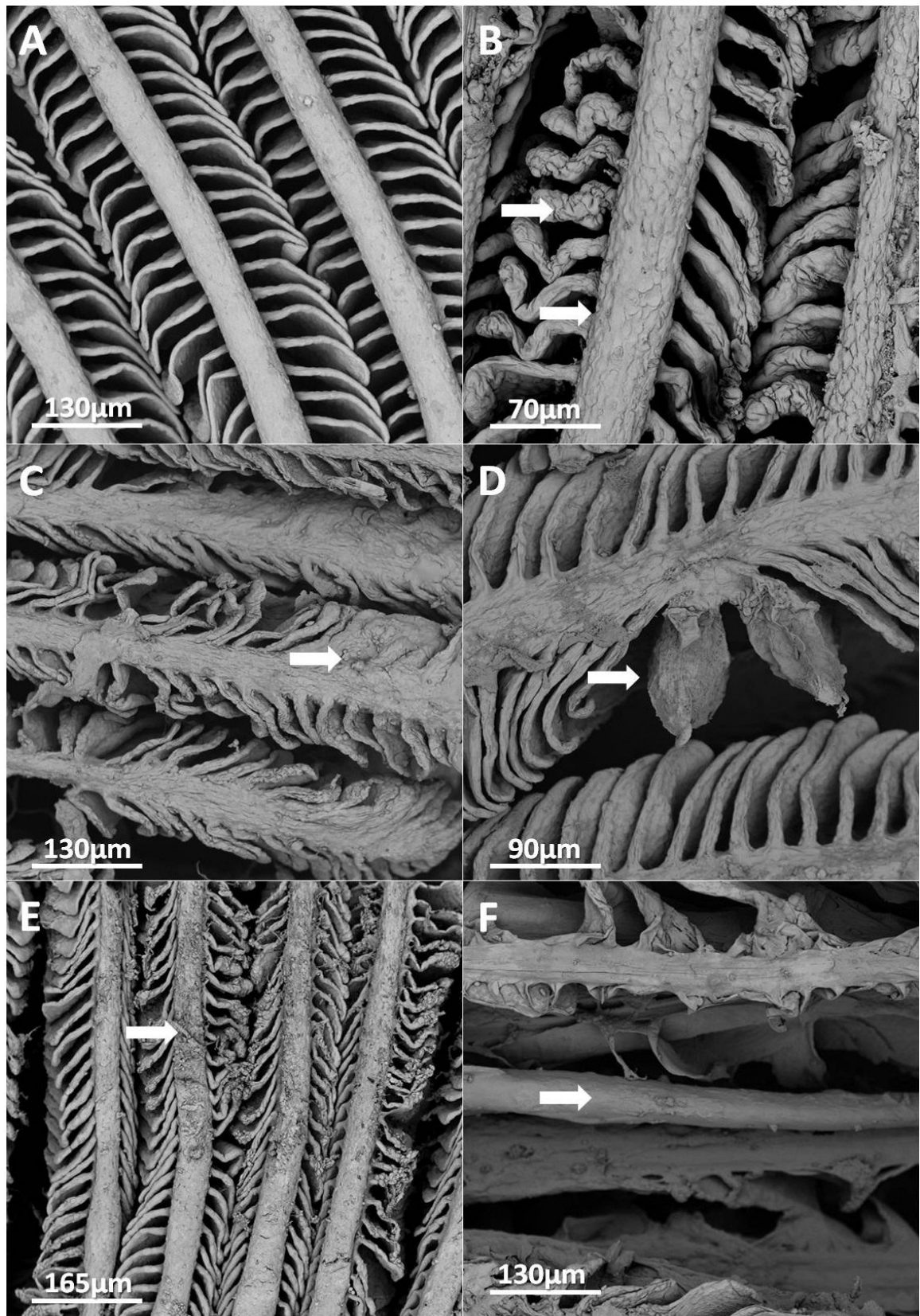
estão relacionadas na TABELA 2 e ilustradas na FIGURA 4, com fusões lamelares, descolamento do epitélio, necrose, morte celular, atrofia das lamelas secundárias, hipertrofia e hiperplasia tecidual, neoplasias e perda de digitações nas lamelas primárias. A aparência normal para este tecido pode ser visualizada na primeira imagem (FIGURA 4A), que apresenta um conjunto de lamelas primárias e lamelas secundárias de aparência regular.



**FIGURA2:** Histopatologia de brânquias de *Hoplias malabaricus* capturados no reservatório do Iraí. A - Brânquia inalterada; B - Alteração estrutural e fragilização do tecido; C - Hipertrofia de lamelas primárias; D - Alterações epiteliais na lamela primária.



**FIGURA 3:** Histopatologia de Brânquias de *Tilapia rendalli* capturadas no reservatório do Iraí. **A** - Brânquia inalterada, lamela primária (→) e lamela secundária (►); **B** - Massas amorfas de células alteradas indicando possíveis tumores (setas); **b** - detalhe em maior aumento da massa celular indicada pela seta em B; **C** - Necrose e descarte de células nas lamelas primárias (seta); **D** - Parasita (seta) e hipertrofias na lamela primária.



**FIGURA4:** Histopatologia de Brânquias de *Astyanax sp.* capturados no reservatório do Iraí. A - Brânquia inalterada; B - Hipertrofia celular nas lamelas primárias e secundárias; C - Fusão lamelar; D - Aneurisma nas lamelas secundárias; E - Degeneração do epitélio; F - Necrose e perda das lamelas secundárias;

## 4.2. HISTOLOGIA DE FIGADO E GÔNADAS

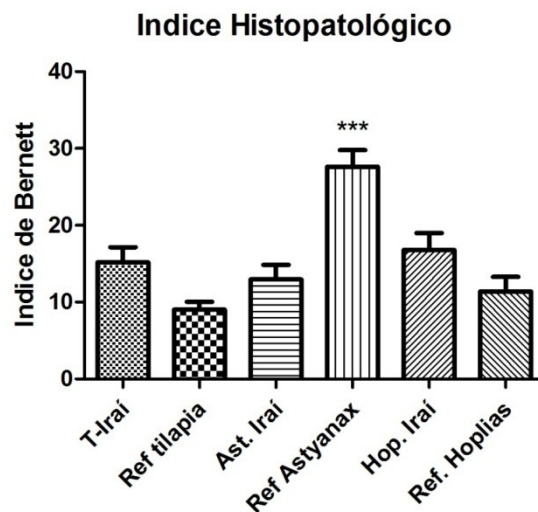
De modo geral, as amostras de fígado apresentaram padrão histológico semelhante ao descrito no capítulo anterior, com hepatócitos poligonais, vasos sinusóides, vasos sanguíneos, ductos e canais biliares distribuídos irregularmente pelo parênquima hepático, além de um tecido pancreático difuso no parênquima hepático, em geral localizado próximo a vasos sanguíneos (GENTEN, TERWINGHE e DANGUY, 2009). No entanto, foram encontradas diversas alterações e danos morfológicos como hipertrofias citoplasmática e nuclear, congestão vascular, hemorragias, presença de parasitas, neoplasias e diferenciação celular em algumas amostras, além de alterações no parênquima pancreático, infiltrações leucocitárias e principalmente focos necróticos, os quais foram encontrados em muitos indivíduos de todos os grupos. Os parâmetros considerados no cálculo do índice de lesão de Bernet e as frequências de ocorrências destes estão agrupados na TABELA 3. Inesperadamente, os grupos referência analisados também mostraram alterações importantes, caso especialmente realçado no grupo referência de *Astyanax sp.* o qual apresentou um índice de lesões bastante elevado. Além disto, embora haja uma tendência para um maior dano nos grupos de tilápia e traíras do reservatório do Iraí, não houve diferença estatística em relação aos respectivos grupos referências. Uma avaliação comparativa do Índice de Bernet para o fígado nos grupos do reservatório e os respectivos grupos referências pode ser observado na FIGURA 5.

Considerando os grupos provenientes dos reservatórios, verificamos através da TABELA 3 que nos itens necrose e neoplasia, dois itens importantes do ponto de vista fisiológico, a frequência foi similar entre os grupos. No entanto, ao considerar outras lesões e alterações é possível observar diferenças claras entre os grupos. As tilápias foram as mais afetadas em alterações como esteatose e colestase, seguido pelas traíras, enquanto os lambaris praticamente não apresentaram registro deste tipo de alteração, mas por outro lado apresentaram grande infestação de parasitas (possivelmente da espécie *Sphaerothecum destruens*). A resposta inflamatória foi mais acentuada no grupo de traíras, assim como a diferenciação celular também foi maior neste grupo. As FIGURAS 6, 7, 8 e 9 ilustram algumas lesões e alterações encontradas neste estudo para as espécies *Astyanax sp.*, *Hoplias malabaricus* e *Tillapia rendali*.

**TABELA3:** Ocorrência de lesões no fígado dos grupos coletados no reservatório do Iraí. TI – *T. rendalli* – Iraí, AI – *Astyanax sp.* – Iraí, HI – *H. malabaricus* – Iraí, Ref T – grupo referência *O. niloticus*, RefA – grupo referência *Astyanax sp.*, RefH – grupo referência *H. malabaricus*. (Obs. Inf. Leucocitária = infiltração leucocitária e Dif. Celular = Diferenciação celular).

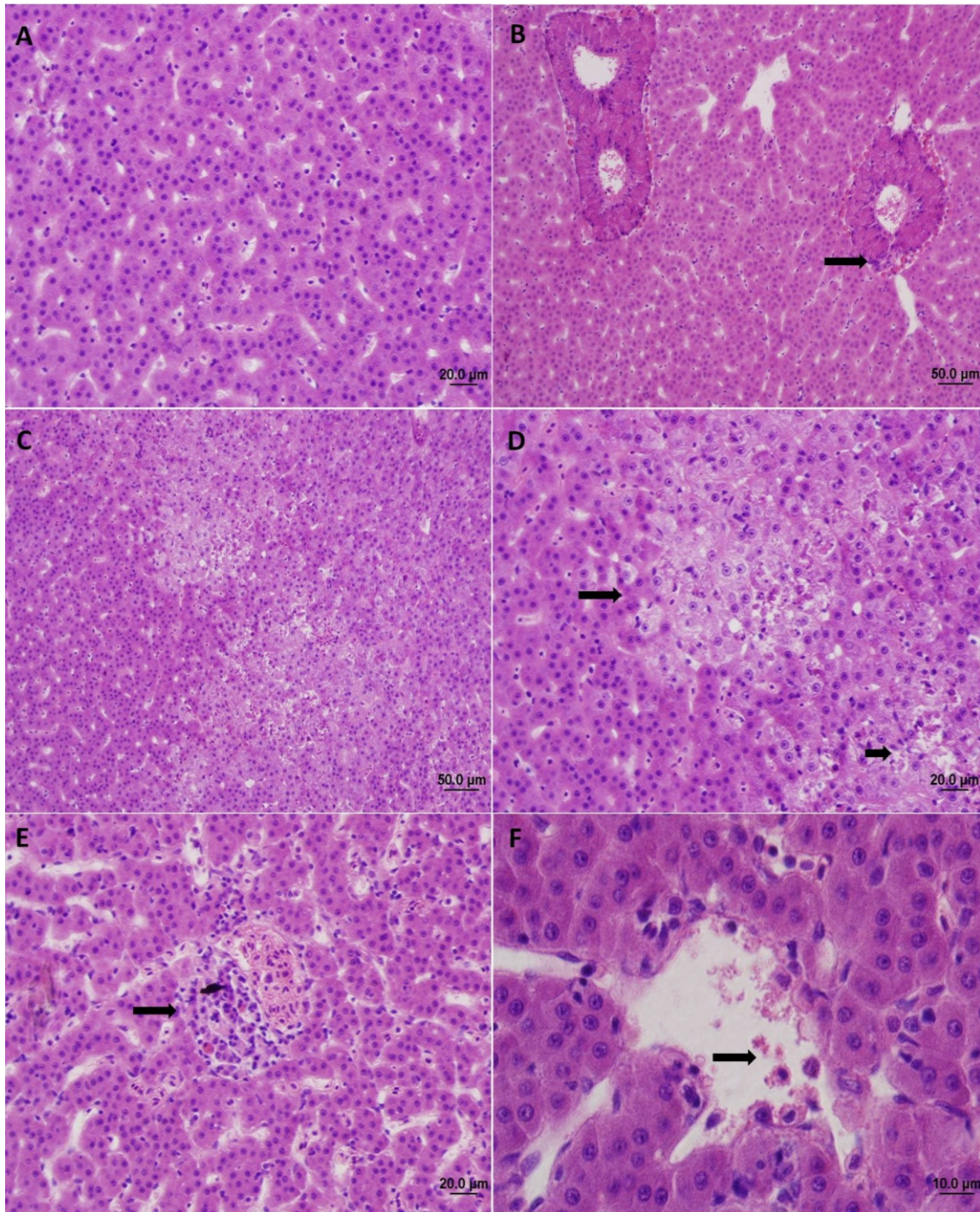
	TI (n=24)	Ref.T (n=10)	AI (n=20)	Ref.A (n=10)	HI (n=15)	Ref. H (n=10)
<b>Necrose</b>	22 (91,6%)	9 (90%)	17(85%)	10 (100%)	14 (93,33%)	9 (90%)
<b>Inf. Leucocitária</b>	9 (37,5%)	2 (20%)	9 (45%)	10 (100%)	12 (80%)	4 (40%)
<b>Parasitas</b>	2 (8,3%)	0	16 (80%)	10 (100%)	1 (6,67%)	0
<b>Neoplasias</b>	1 (4,2%)	0	1 (5%)	0	1 (6,67%)	0
<b>Dif. Celular</b>	1 (4,2%)	0	1 (5%)	0	2 (13,32%)	1 (10%)
<b>Esteatose</b>	7 (29,2%)	0	1 (5%)	1 (10%)	2 (13,32%)	0
<b>Colestase</b>	14 (58,3%)	10(100%)	0	1 (10%)	5 (33,33%)	5 (50%)
<b>MMCs* (MMCs/mm<sup>2</sup>)</b>	0,9650	0,901	0	-	0,9422	0,881

\*Média dos quinze campos avaliados em cada corte



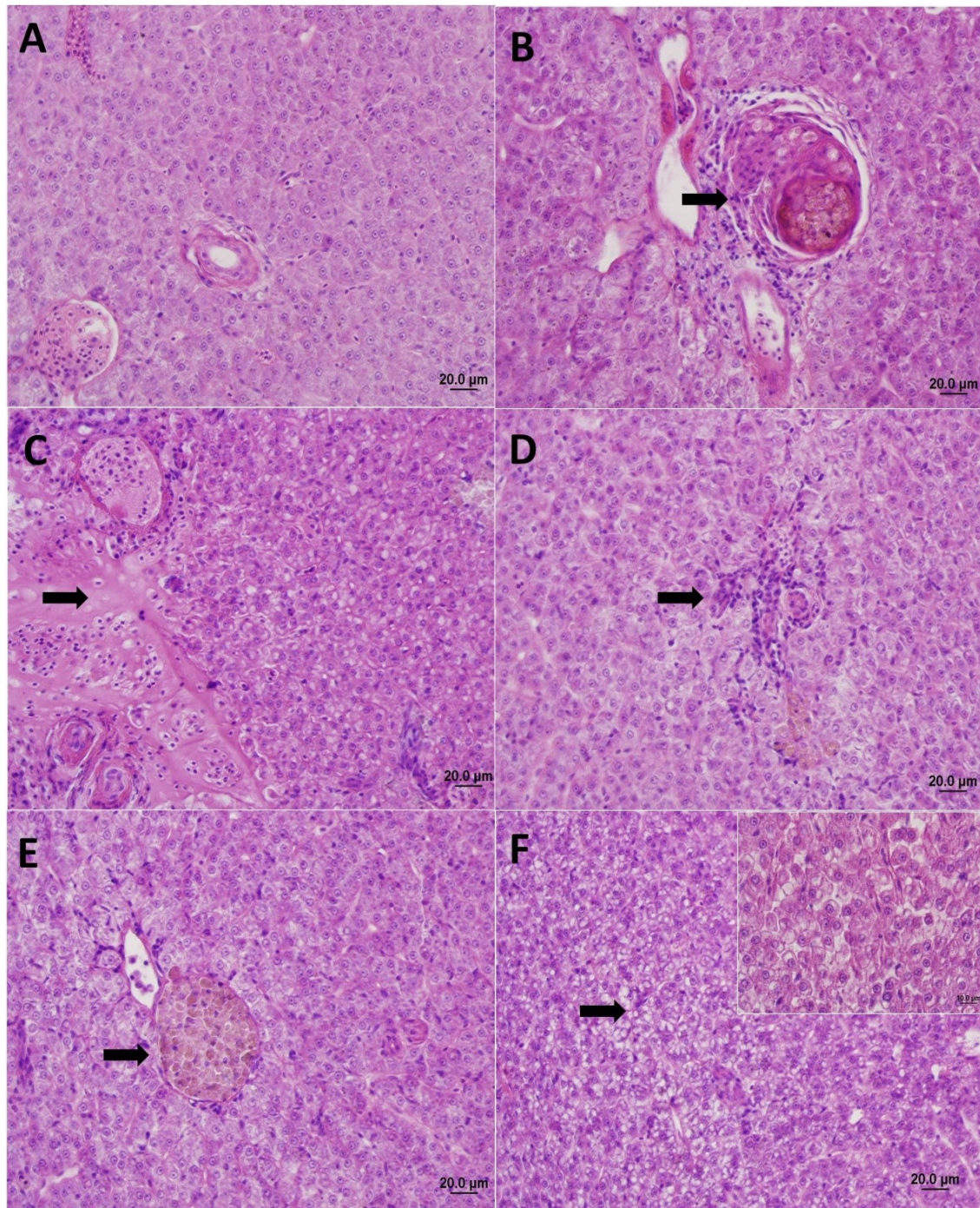
**FIGURA5:** Valores médios do índice de alterações histopatológicas (Índice de Bernet) do fígado nas três espécies expostas cronicamente no reservatório do Iraí e seus respectivos grupos de referência. Os resultados expressam média ± erro médio. (Obs: \* diferença significativa em relação ao grupo referência).





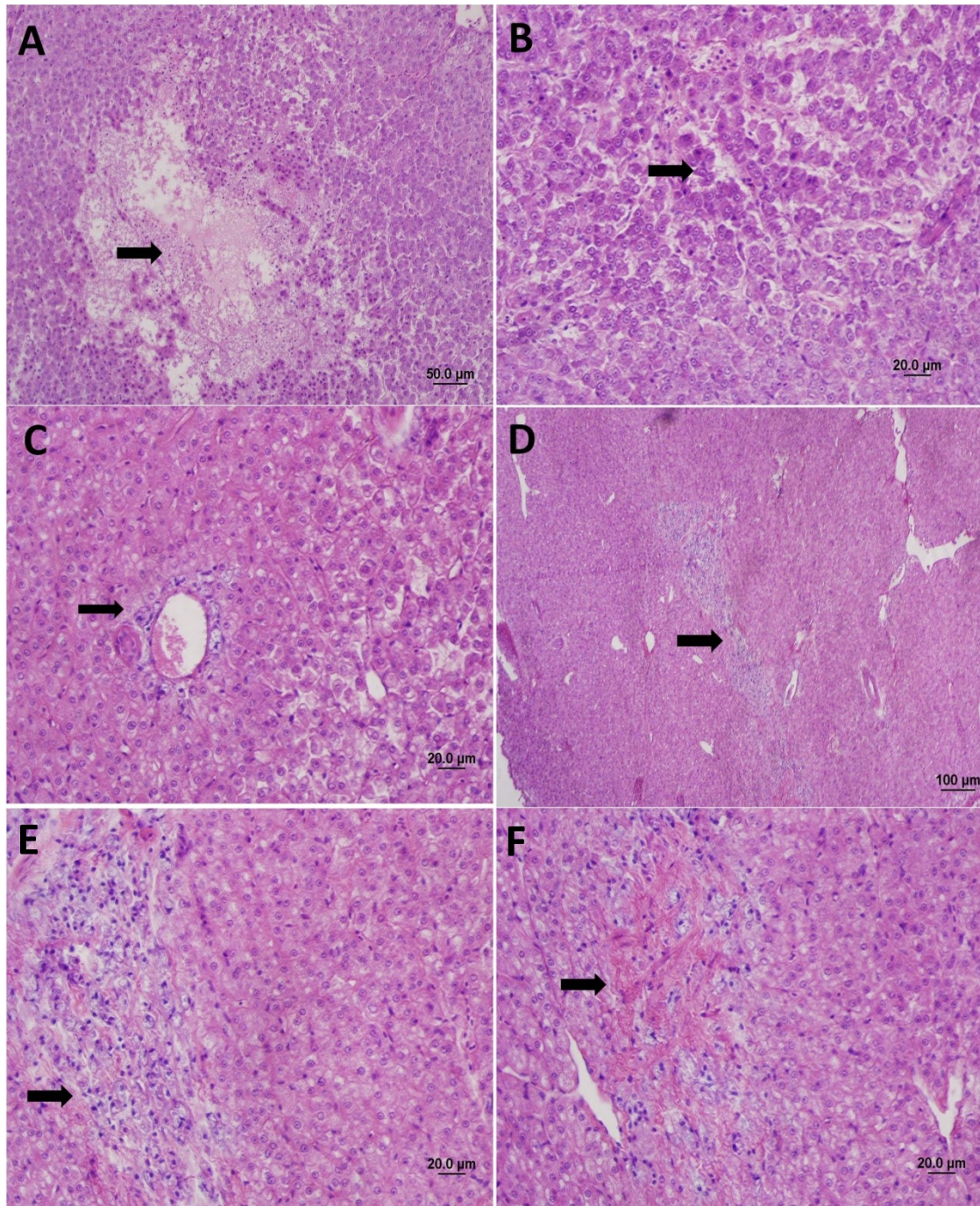
**FIGURA 6:** Corte histológico de fígado - grupo *Astyanax sp.* Iraí. A – Parênquima hepático inalterado; B – Infestação de parasitas próximo ao tecido pancreático (seta); C – Diferenciação tecidual com parênquima hepático não homogêneo, indicando focos de células com metabolismo alterado; D – Focos de alteração celular e necrose (setas); E – Diferenciação celular e infiltração leucocitária próxima à um vaso sanguíneo; F – Degeneração do endotélio do vaso. Coloração Hematoxilina e Eosina.





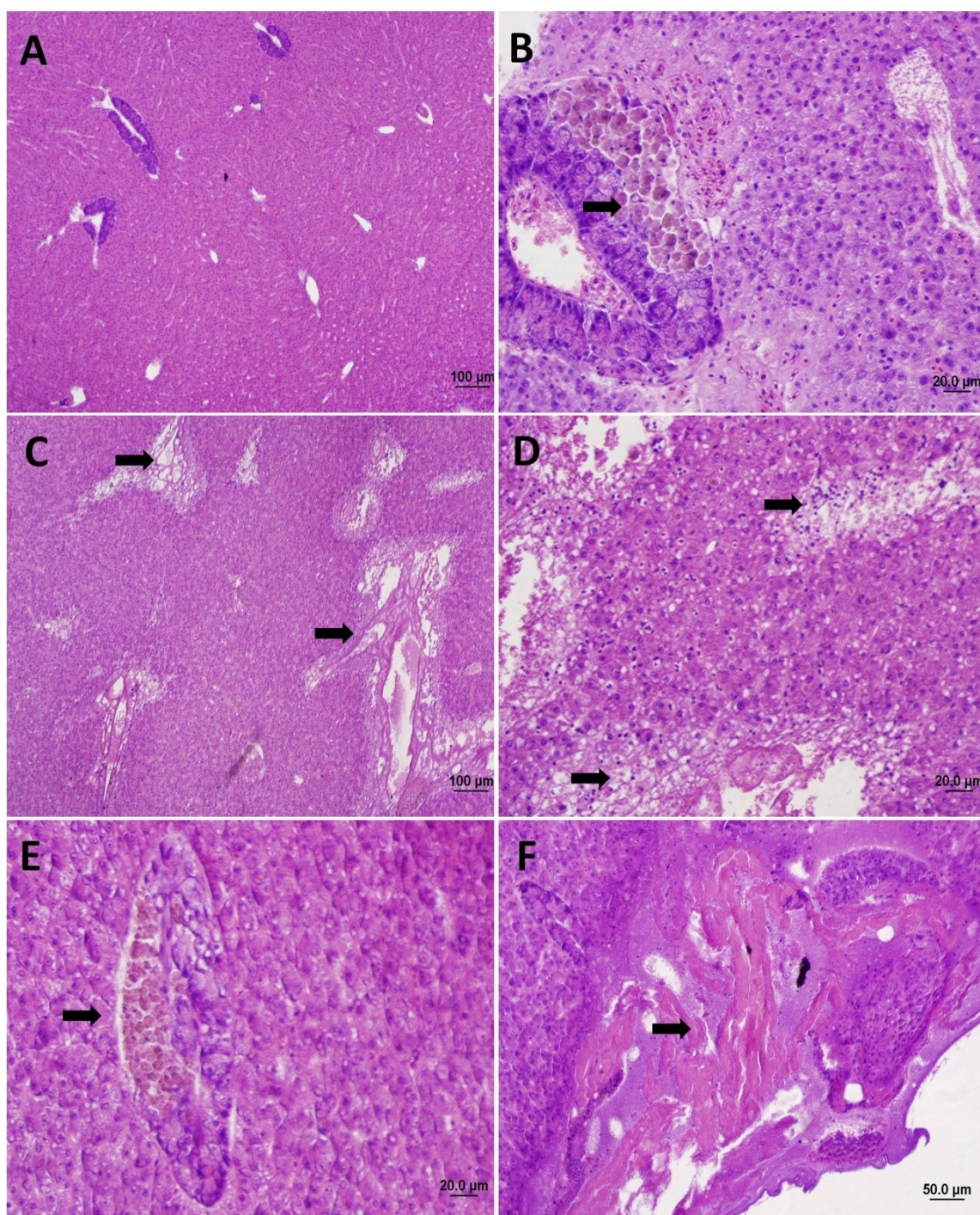
**FIGURA 7:** Corte histológico de fígado – grupo *H. malabaricus* Iraí. A – Parênquima hepático inalterado; B – Neoplasia (seta); C – Necrose com fibrose tecidual (seta); D – Infiltração leucocitária (seta); E – Centro de melanomacrófagos associado a vaso; F – Esteatose (no detalhe é mostrado um maior aumento de uma região vacuolizada associada à pequenos focos necróticos (barra = 10µm). Coloração Hematoxilina e Eosina.





**FIGURA 8:** Corte histológico de fígado - Grupo *H. malabaricus* Iraí. A – Foco necrótico (seta); B – Tecido diferenciado com perda da coesão tecidual (seta); C – Alteração celular próxima ao vaso sanguíneo e pequenos focos necróticos (seta); D e E – Áreas pré necróticas e de diferenciação celular (setas); F – Área de necrose e fibrose tecidual. Coloração Hematoxilina e Eosina.



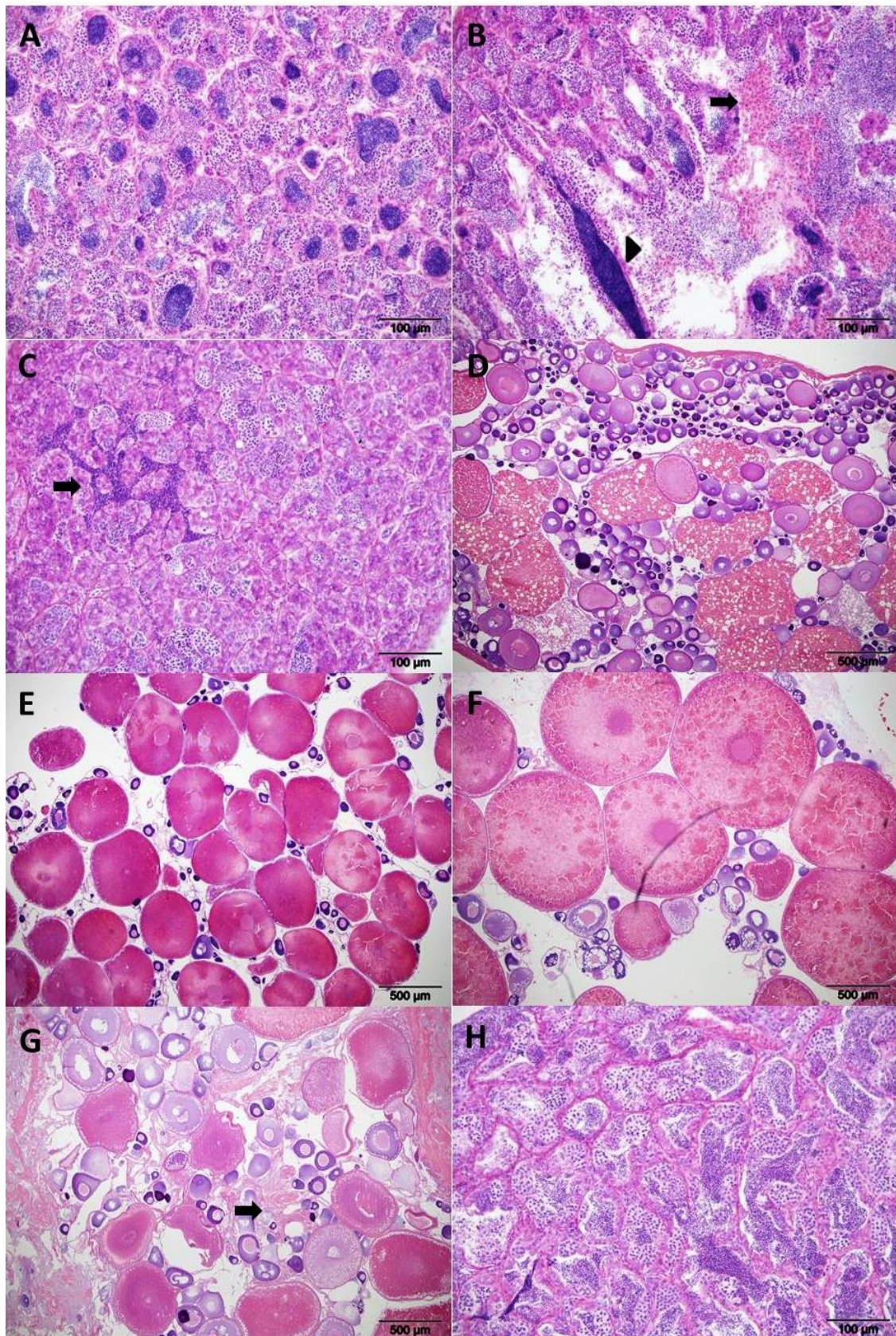


**FIGURA9:** Corte histológico de fígado - Grupo *Tilapia rendalli* Iraí. A – Parênquima hepático inalterado; B – Centro de melanomacrófico (seta preta) associado à área de necrose e hemorragia próxima ao tecido pancreático; C – Focos necróticos (seta); D – Focos de esteatose (seta preta) associada a áreas de necrose (seta branca); E – Centro de melanomacrófagos no tecido pancreático (seta); F – Extensa área de diferenciação celular e neoplasia. Coloração Hematoxilina e Eosina.

Na avaliação das gônadas dos três grupos coletados no reservatório do Iraí foram observadas características semelhantes às descritas em Genten, Terwinghe e Danguy, 2009. Grande parte das gônadas analisadas apresentou um padrão avançado de desenvolvimento, com células germinativas em diferentes estágios de

maturação e abundância de espermatozoides e folículos vitelogênicos bem desenvolvidos. Em *Astyanax sp.* foram analisadas apenas gônadas femininas, as quais apresentaram um padrão morfológico de aparência regular, sem alterações, com predominância de folículos vitelogênicos em estágio avançado de maturação (FIGURA 10E-F), o que pode sugerir uma predominância do hábito de desova total, assim como já foi descrito em *Astyanax aff. fasciatus* no reservatório do Iraí (SILVA *et al.*, 2010). No grupo *H. malabaricus*(FIGURA 10G-H) o desenvolvimento dos ovócitos foi predominantemente assincrônico, confirmando o padrão característico de desova parcelada desta espécie (BARBIERI, 1989). Também foram encontradas algumas lesões de baixa frequência como pequenos focos necróticos e presença de parasitas em machos, folículos atrésicos e uma ocorrência neoplásica em fêmeas e, ainda, presença de centros de melanomacrófagos em ambos os sexos. No grupo *T. rendalli*, por outro lado, foram encontradas mais alterações que nos outros grupos avaliados (FIGURA 10A-D), com ocorrência de algumas lesões de caráter mais severo como necrose, hemorragia e infiltração leucocitária em alguns machos, além da presença de folículos atrésicos e vários folículos vitelogênicos com formatos irregulares nas fêmeas.





**FIGURA 10:** Corte histológico das gônadas dos animais coletados no reservatório do Iraí. (A - D – Grupo *T. rendalli*). A – Corte de testículo apresentando estrutura normal com diferentes estágios de desenvolvimento dos espermatozoides; B – Corte de testículo apresentando extensa área necrótica (cabeça de seta) acompanhada de hemorragia (seta); C – Corte de testículo apresentando infiltração leucocitária. D – Corte de ovário mostrando oócitos em diferentes estágios de maturação, com predominância de folículos em estágio inicial de desenvolvimento; (E e F – *Astyanax sp.*) E e F –

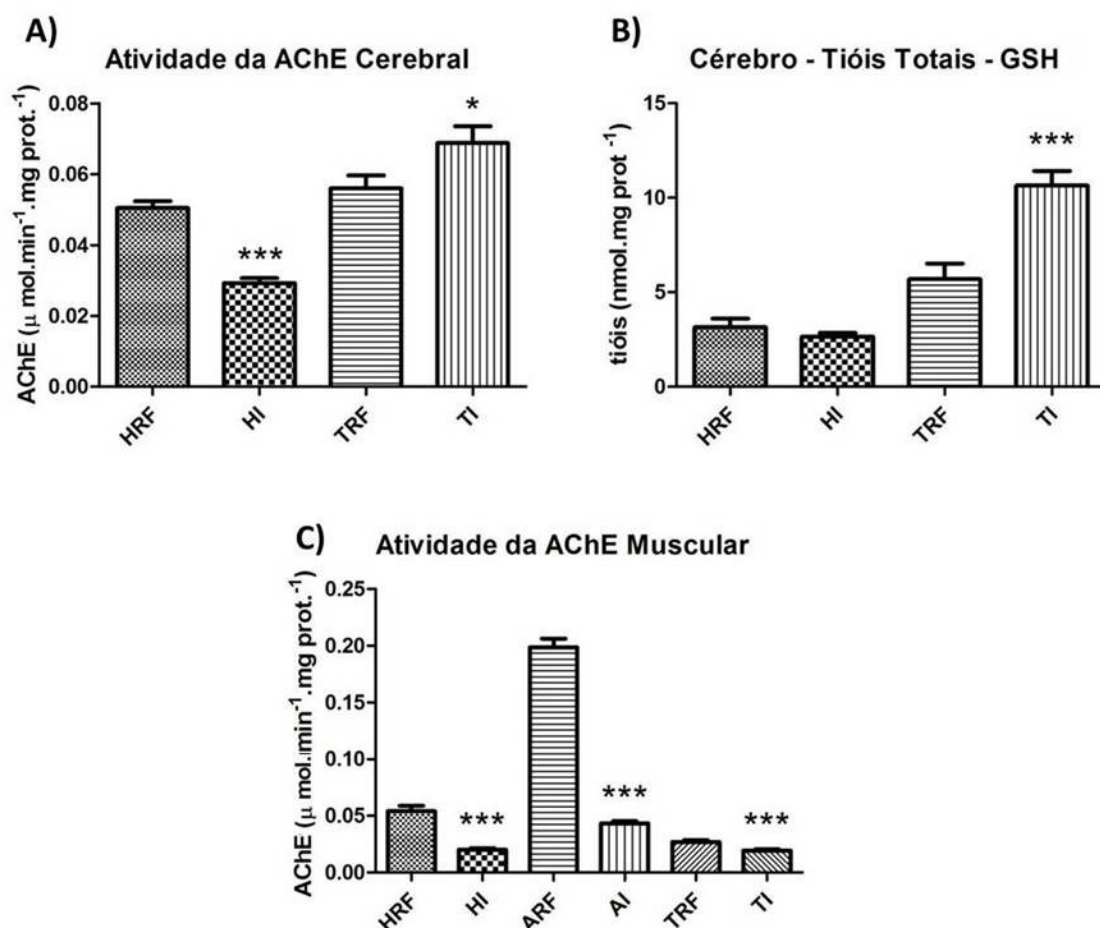
Cortes de ovários mostrando predominância de oócitos em estágios avançados de maturação; (G e H – *H. malabaricus*) G – Corte de ovário mostrando folículos vitelogênicos com morfologia alterada e presença de folículo atresico (seta); H – Corte de testículo mostrando células em diferentes estágios de maturação. Coloração Hematoxilina e Eosina.

#### 4.3. ANÁLISES BIOQUÍMICAS – CÉREBRO E MÚSCULO

A partir do tecido cerebral coletado nas tilápias e traíras, foram realizadas análises bioquímicas para avaliação da atividade específica da acetilcolinesterase (AChE) (Figura 11A) e do conteúdo de tióis não protéicos, incluindo a glutatona reduzida – GSH (Figura 11B), e a partir do tecido muscular coletado nas três espécies foi analisada a atividade específica da acetilcolinesterase (AChE). O grupo de tilápias cronicamente exposto no Iraí (TI) apresentou um aumento significativo em relação ao grupo referência (TRF) tanto para a AChE como para GSH em ambas as análises realizadas com o cérebro, enquanto o grupo *Hoplias malabaricus* (HI) apresentou apenas uma diminuição da atividade da acetilcolinesterase cerebral em relação ao grupo referência (HRF). Infelizmente, o grupo *Astyanax sp.* não foi incluído nas análises com cérebro devido às limitações na obtenção de amostras suficientes para realização destas análises.

Por outro lado, a atividade específica da AChE muscular foi medida em todos os grupos e resultou em uma diminuição significativa nos três grupos crônicos do Iraí em relação aos grupos referências respectivos (Figura 11C).





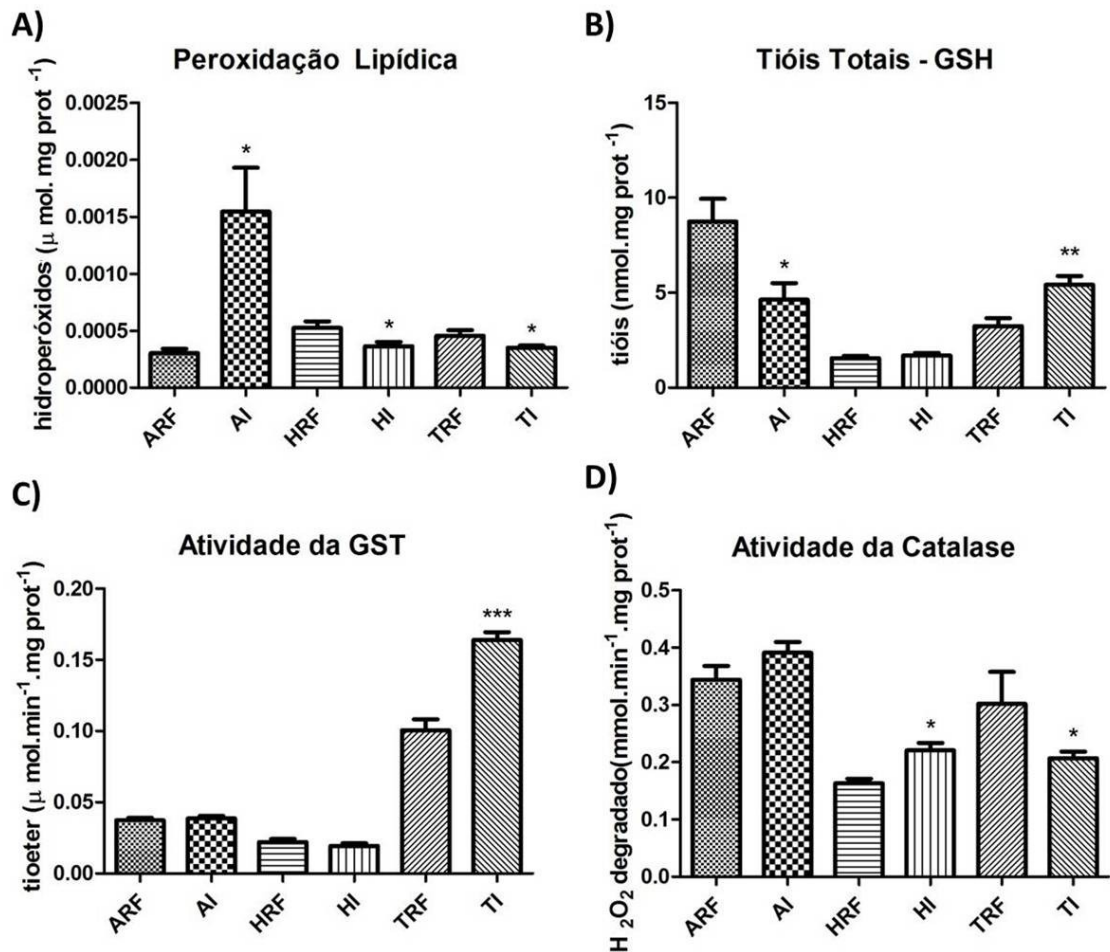
**FIGURA 11** – Análises bioquímicas realizadas em cérebro e músculos dos animais avaliados. (A) AChE Cerebral. (B) Conteúdo de GSH e outros tióis não protéicos cerebrais. (C) AChE muscular. Os resultados expressam média  $\pm$  erro médio. OBS: HRF – Grupo *H. malabaricus* referência; HI – Grupo *H. malabaricus* Iraí; ARF – Grupo *Astyanax sp.* referência; AI – grupo *Astyanax sp.* Iraí; TRF – Grupo *Tilapia* referência; TI – Grupo *Tilapia rendalli* Iraí; \* -  $0,05 > p > 0,01$ , \*\* -  $0,01 > p > 0,001$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ .

#### 4.4. ANÁLISES BIOQUÍMICAS – FÍGADO

Nas análises bioquímicas realizadas no fígado, foram encontradas alterações significativas nos níveis de peroxidação lipídica em todos os grupos crônicos em relação aos grupos referências, com níveis maiores no grupo de lambaris e menores nos grupos de tilápia e traíra provenientes do Iraí (FIGURA 12A). Na avaliação de conteúdos de tióis não protéicos, incluindo a glutatona reduzida GSH, foi encontrada apenas uma redução no grupo dos lambaris e um aumento no grupo das tilápias em relação aos grupos referência (FIGURA 12B), enquanto a atividade específica da GST aumentou apenas no grupo crônico de tilápias (FIGURA 12C). Além disto, também foram encontrados resultados distintos na avaliação da atividade específica



da catalase, onde houve um aumento na atividade no grupo das traíras e uma redução no grupo das tilápias do Iraí (FIGURA 12D).



**FIGURA 12** – Análises bioquímicas realizadas no fígado dos animais avaliados. A) Peroxidação lipídica (LPO); (B) Conteúdo de GSH e outros tióis não protéicos; (C) Atividade específica da GST; (D) Atividade específica da catalase. Os resultados expressam média  $\pm$  erro médio. OBS: HRF – Grupo *H. malabaricus* referência; HI – Grupo *H. malabaricus* Iraí; ARF – Grupo *Astyanax sp.* referência; AI – grupo *Astyanax sp.* Iraí; TRF – Grupo *Tilapia* referência; TI – Grupo *Tilapia rendalli* Iraí; \* -  $0,05 > p > 0,01$ , \*\* -  $0,01 > p > 0,001$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ .

## 5. DISCUSSÃO

No último relatório do IAP, o reservatório do Iraí foi avaliado como criticamente degradado à poluído, com características de eutrofização, elevada densidade de cianobactérias, alto teor de matéria orgânica e elevado déficit de oxigênio na coluna de água (IAP, 2009b). Estas condições revelam um grande potencial de impacto sobre o ecossistema deste reservatório e as relações ecológicas que ali se desenvolvem. Neste contexto, o presente trabalho buscou avaliar diferenças de respostas à poluição aquática em três grupos distintos de peixes do reservatório, visando desta maneira investigar variações de sensibilidade que possam interferir na capacidade de sobrevivência e reprodução destes animais. Foram utilizados biomarcadores morfológicos e bioquímicos que representam diferentes níveis de organização biológica, através dos quais foram diagnosticadas alterações fisiológicas e teciduais como será discutido a seguir.

Em todos os grupos provenientes do reservatório do Iraí foram encontradas diversas lesões e alterações histológicas, as quais sugerem um sinergismo de efeitos da exposição à xenobióticos presentes no reservatório do Iraí. No grupo *H. malabaricus* predominaram as necroses e infiltrações leucocitárias, enquanto no grupo *T. rendalli*, além de lesões permanentes como as necroses, também se destacaram alterações reversíveis como a esteatose e a colestase, ambas relacionadas a um distúrbio no metabolismo dos hepatócitos e consideradas potenciais vias pré-necróticas. Apesar da alta incidência de necroses no grupo *Astyanax sp.*-Iraí, não foram encontradas neste grupo alterações tão relevantes quanto às encontradas nos outros grupos do Iraí, exceto pela alta proliferação de parasitos unicelulares. Além disto, também destacou-se na análise histopatológica do fígado uma degeneração aparente do epitélio vascular encontrada em alguns indivíduos de todos os grupos crônicos do Iraí, o que pode indicar um comprometimento vascular capaz de gerar processos isquêmicos que resultam em morte celular e originam os grandes focos necróticos (WOLF e WOLFE, 2005, METCALFE, 1998). Também foram encontrados em *H. malabaricus* focos de perda da coesão tecidual que podem indicar interferência na adesão dos hepatócitos, um fenômeno já estudado em experimentos com contaminantes como o chumbo e endosulfan (PEYRE *et al.*, 2012; GIULIANE *et al.*, 2005). Além disto, lesões semelhantes às encontradas neste trabalho também foram descritas em fígado de *Astyanax sp.* expostos a TBT e em áreas onde houve derramamento de óleo (SILVA

*et al.*, 2008; AKAISHI *et al.*, 2004; OLIVEIRA RIBEIRO *et al.* 2002), assim como em *H. malabaricus* expostos a pesticidas e PCB (MIRANDA *et al.*, 2008) e em *Pimelodus maculatus* capturados em um reservatório de abastecimento de água impactado (BRITO *et al.*, 2012).

Inesperadamente, o grupo *Astyanax sp.* referência apresentou um índice bastante elevado de lesões e alterações histopatológicas devido à alta incidência de necroses, respostas inflamatórias e presença de parasitas. Neste caso, é possível que a infestação parasitária exacerbada tenha induzido uma resposta inflamatória crônica, que por sua vez resultou na formação de focos necróticos como os encontrados neste grupo. Durante a resposta inflamatória, inúmeros mediadores bioquímicos citotóxicos são liberados no meio extracelular, fazendo com que uma resposta prolongada promova ativação dos sistemas de estresse celular e geração de danos no tecido (FEIST e LONGSHAW, 2008)

Apesar do grupo *H. malabaricus*-Iraí ter apresentado um número maior de lesões de caráter mais severo, o grupo *Astyanax sp.*-Iraí também se destacou pela ausência de centros de melanomacrófagos (CMM), assim como uma alta incidência de parasitas no fígado, demonstrando um possível efeito supressor do sistema imune nestes animais, uma vez que os CMMs constituem agrupamentos de macrófagos pigmentados que atuam principalmente na resposta imune e fagocitose de substâncias extracelulares (WOLF e WOLFE, 2005, AGIUS e ROBERTS, 2003). Vários contaminantes ambientais como metais, hidrocarbonetos e alguns pesticidas e herbicidas tem efeitos imunotóxicos em peixes, induzindo redução da atividade de macrófagos, da mitogênese, da resposta humoral e alterações no número de células de defesa, que tornam os animais mais suscetíveis a doenças e infecções parasitárias (O'HALLORAM, AHOKAS E WRIGHT, 1998). A redução dos CMMs foi descrita por Miranda *et al* (2008) como uma desordem no sistema imunológico em peixes expostos a pesticidas organoclorados e bifenis policlorados (PCBs). Contudo, a interpretação dos efeitos de xenobióticos sobre CMMs em estudos de campo ainda é controversa, pois muitos estudos relatam tanto o aumento quanto o decréscimo destas estruturas e, além disto, ainda são poucos os dados sobre variações naturais da resposta imune em muitas espécies, o que acaba dificultando a correta interpretação acerca das causas da alteração imune (O'HALLORAM, AHOKAS E WRIGHT, 1998; WOLKE, 1992).

Como foi discutido no capítulo anterior, muitos xenobióticos podem atuar sobre o sistema reprodutivo dos animais, alterando a função hormonal endógena e o comportamento reprodutivo dos organismos, além de também causarem lesões, hemorragias e mal-formações nas gônadas (MLANDO *et al.*, 2009). Na análise das gônadas, o grupo *T. rendalli*-Iraí mostrou-se mais sensível, com algumas amostras contendo grandes focos necróticos, hemorragias e infiltrações leucocitárias, os quais demonstram a presença de fatores indutores de morte celular nas gônadas destes animais. Como possuem o hábito de guardar o ninho após a fecundação, muitas tilápias apresentam baixa fecundidade (EL-SAYED, 2006), o que pode representar um risco de redução da taxa reprodutiva quando associado a efeitos de desreguladores endócrinos tais como os que foram observados no reservatório do Iraí em estudos com tilápias (YAMAMOTO, 2012).

Algumas lesões também foram encontradas no grupo *H. malabaricus*-Iraí, que apresentou pequenos focos necróticos em alguns indivíduos machos e proliferação celular com aspecto neoplásico em uma fêmea, mostrando que este grupo também está sofrendo a ação de substâncias tóxicas que causam alterações nas gônadas. No grupo *Astyanax sp.*-Iraí, por outro lado, não foram encontradas lesões histológicas, porém houve uma predominância considerável de fêmeas no grupo. Apesar desta proporção sexual ser uma característica aparentemente comum em *Astyanax sp.* (SILVA *et al.*, 2010; ABILHOA e AGOSTINHO, 2007), é difícil distinguir se ela ainda se mantém num padrão normal ou se está sendo afetada pela ação de contaminantes tóxico-reprodutivos. Durante o desenvolvimento inicial, muitos peixes ficam mais suscetíveis à ação de desreguladores endócrinos, os quais podem acabar induzindo a diferenciação tecidual e mudança de sexo, impactando assim a manutenção de populações (KIDD *et al.*, 2007). Uma proporção consideravelmente maior de fêmeas também foi encontrada por Prado *et al.* (2011) em *Astyanax fasciatus* coletados em um reservatório impactado de Minas Gerais, assim como também foi descrita a redução no desenvolvimento gonadal neste mesmo estudo e em outro realizado com animais desta mesma espécie, coletados em um rio com diferentes gradientes de contaminação (SCHULZ e MARTINS-JUNIOR, 2001).

Muitos estudos tem revelado que grande parte dos efeitos estrogênicos observados em campo são causados pelo 17 $\alpha$ -etinilestradiol, um estrogênio sintético utilizado em contraceptivos que está presente em ambientes aquáticos contaminados com efluentes de esgoto doméstico (VAN DER OOST, BEYER, VERMEULEN, 2003). Isto pode sugerir que as lesões nas gônadas encontradas

neste trabalho também podem ser devidas aos efeitos de estrogênios sintéticos, uma vez que o reservatório do Iraí recebe elevada carga de efluentes de esgoto doméstico clandestino.

Contrariamente ao padrão obtido nas análises histopatológicas de fígado e gônadas, nos grupos do reservatório do Iraí, o grupo *Astyanax sp.* foi o que apresentou o maior número de alterações nas brânquias, enquanto o grupo *H. malabaricus* ficou no outro extremo, com o menor número de lesões. Possivelmente isso se deve ao comportamento destas duas espécies, pois enquanto as traíras são mais sedentárias, movimentando-se principalmente durante o entardecer e a noite (CARVALHO, FERNANDEZ e MOREIRA, 2002), os lambaris, por outro lado, são extremamente ativos e se movimentam continuamente, ficando portanto mais expostos aos poluentes encontrados na coluna de água. Foram observadas diversas alterações nas brânquias dos lambaris, inclusive alterações de tipo irreversível como neoplasias e morte celular, ou mesmo atrofia do órgão, as quais já foram associadas à exposição a agentes tóxicos em diversos trabalhos, como demonstrado em experimentos com peixes confinados em um ribeirão urbano contaminado (CAMARGO E MARTINEZ, 2007), em peixes capturados em um reservatório impactado (BRITTO *et al.*, 2012), e ainda em experimentos de exposição a zinco (SANTOS *et al.* 2011) e cádmio (TOPHON *et al.*, 2003). A proliferação do epitélio lamelar associada à fusão parcial ou completa de lamelas secundárias são considerados mecanismos de proteção por alguns autores, pois reduzem a área de superfície epitelial exposta a agentes tóxicos, por outro lado, isto também acaba sendo nocivo aos peixes, pois reduz a superfície de trocas gasosas nas lamelas, limitando desta maneira a capacidade de oxigenação das brânquias (CAMARGO e MARTINEZ, 2007). Também foram encontradas algumas alterações epiteliais e áreas hiperplásicas nas brânquias dos outros grupos avaliados, mas em proporções consideravelmente menores que em *Astyanax sp.*-Iraí, indicando que este grupo apresenta-se particularmente sensível em exposições hídricas, sendo indicado como um bom bioindicador da presença de xenobióticos dissolvidos na água. Diferentemente da espécie *H. malabaricus*, cujos resultados histopatológicos evidenciaram a sensibilidade deste como bioindicador de exposição crônica pela via trófica, e também da espécie *T. rendalli*, que por sua vez mostrou-se como um bioindicador interessante tanto para exposição hídrica quanto trófica, pois apresentou efeitos intermediários de sensibilidade à ambos os tipos de exposição (o

que ressalta sua importância como um bom bioindicador em estudos de avaliação *in situ*, como demonstrado no primeiro capítulo).

Diversos estudos em biomonitoramento também relacionam o aporte de muitas classes de poluentes com a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS), as quais reagem com macromoléculas críticas promovendo efeitos nocivos como carbonilação de proteínas e peroxidação de lipídeos, o que poderia explicar, ao menos em parte, a ocorrência das lesões e alterações encontradas no fígado dos animais avaliados (VAN DER OOST, BEYER, VERMEULEN, 2003). Entretanto, ao avaliar o estado de peroxidação lipídica dos peixes coletados no Iraí, foi encontrado um nível maior de peroxidação lipídica em *Astyanax sp.* do que em *H. malabaricus* e *T. rendalli*, que em contrapartida apresentaram índices maiores de lesões histopatológicas, sugerindo deste modo a interferência de outros fatores além do estresse oxidativo atuando na morte das células nestes grupos. Além disto, este aumento da LPO no grupo de lambaris pode evidenciar uma menor eficiência deste grupo em seu sistema anti-oxidante, resultando em maior geração de espécies reativas que podem causar danos às membranas celulares. Como descrito no primeiro capítulo deste trabalho, diversos estudos tem relacionado o aumento da LPO em peixes à exposição à uma variedade de substâncias tóxicas como microcistinas, metais, pesticidas e também em peixes capturados em rios impactados (CAVALHEIRO DE MENEZES *et al*, 2011, SILVA *et al.*, 2009, PRIETO *et al*, 2006, FERREIRA *et al* 2005, ROMEO *et al*, 2000).

A evidência da alteração no sistema antioxidante mostrada nas análises de LPO dos lambaris do reservatório do Iraí é corroborada pela depleção dos níveis de tióis totais incluindo a GSH encontrada neste grupo. A GSH funciona como uma ferramenta de adaptação ao estresse celular através da neutralização de espécies reativas de oxigênio (EROs), logo, baixos níveis deste tiol podem indicar a ocorrência de uma atividade intensa de neutralização de espécies reativas no combate ao estresse oxidativo (VAN DER OOST, BEYER, VERMEULEN, 2003). No entanto, quando a manutenção dos estoques de GSH não é suficiente para neutralização das EROs geradas, a redução nos estoques de GSH acaba limitando a conjugação desta molécula com compostos tóxicos, os quais por sua vez tem maior capacidade de reagir com os lipídeos aumentando os níveis de peroxidação lipídica.

Da mesma forma, o aumento da GSH hepática no grupo *T. rendalli* pode ser a causa da redução dos níveis de peroxidação lipídica hepática, pois a GSH pode

estar limitando as reações entre os compostos tóxicos e os lipídeos. Como a conjugação da GSH com compostos eletrofílicos (ou metabólitos da fase I) é catalisada pelas glutatona-S-transferases (GSTs), o aumento na atividade da GST nas tilápias do Iraí, associado aos altos níveis de GSH, acabam diminuindo a chance de ocorrência de reações intracelulares adversas causadas por EROs (BOELSTERLI, 2007). A indução da GST também foi anteriormente descrita como forma de adaptação em peixes expostos a pesticidas (MENEZES *et al.*, 2011), fenantreno (SHAILAJA e D'SILVA, 2003), sedimentos contaminados com dioxina e metais (CHEN *et al.*, 1998), além de peixes capturados em rios impactados (SILVA *et al.*, 2009), assim como em hepatócitos de *H. malabaricus* expostos a misturas complexas de compostos halogenados lipofílicos (FILIPAK NETO *et al.*, 2007).

Além disto, o aumento na atividade da GST já foi descrito na literatura como resposta compensatória para a redução na atividade da catalase (CLEMENTE *et al.*, 2010), o que poderia explicar o aumento da GST no grupo *T. rendalli* – Iraí associado à redução encontrada na atividade da catalase para este grupo. Em contrapartida, no grupo *H. malabaricus*-Iraí foi encontrada uma indução na atividade enzimática da catalase e, embora não haja significância estatística, parece haver também uma tendência de indução da atividade da catalase no grupo *Astyanax sp.* - Iraí. A catalase é uma enzima do sistema antioxidante que metaboliza o peróxido de hidrogênio (o qual é altamente reativo) em oxigênio molecular e água (VAN DER OOST, BEYER, VERMEULEN, 2003). A geração de espécies reativas em excesso pode ativar enzimas como, por exemplo, a superóxido dismutase, que durante a neutralização das espécies reativas acaba produzindo peróxido de hidrogênio e induzindo a catalase (SMART e HODGSON, 2008). Desta maneira, a indução da catalase no grupo de traíras do Iraí é mais um indício que evidencia a ativação do sistema de defesa anti-oxidante nestes animais, podendo ser inclusive a causa para a redução da LPO encontrada neste grupo. O aumento na atividade da catalase hepática já foi demonstrado em peixes expostos à cobre (FIRAT e KARGIN, 2010), compostos orgânicos halogenados (FILIPAK NETO *et al.*, 2007) e também em estudos em campo (FERREIRA *et al.*, 2005), assim como o decréscimo da atividade também já foi descrito em estudos de laboratório após exposição à cádmio e cobre (ROMEO *et al.* 2000).

É importante destacar que a interpretação de resultados obtidos em estudos de campo é de difícil análise, pois podem ocorrer interferências tanto de fatores

naturais quanto antropogênicos, principalmente em biomarcadores de nível molecular, como os de estresse oxidativo, pois são altamente moduláveis e podem responder a diferentes variáveis individuais (fisiológicas) e ambientais (parâmetros físico-químicos). Entretanto, apesar da variabilidade de respostas destes biomarcadores, a análise conjunta dos resultados encontrados ao longo deste trabalho, aliados aos relatórios sobre a contaminação do reservatório do Iraí, reforçam a relevância da investigação destes biomarcadores como respostas celulares indicadoras de efeitos da exposição à contaminação aquática.

Além de parâmetros ligados ao estresse oxidativo, as atividades neurológicas e comportamentais de animais também podem ser extremamente sensíveis a contaminação ambiental (BRETAUD *et al.*, 2000), o que motivou no presente estudo a avaliação da atividade da acetilcolinesterase (AChE), uma enzima envolvida em processos sinápticos que tem sido muito utilizada como biomarcador de exposição e de efeito a contaminantes neurotóxicos. Na avaliação de biomarcadores em cérebro nos grupos do Iraí, houve um aumento da atividade enzimática da AChE e concentração de GSH no grupo *T. rendalli* e uma diminuição da AChE em *H. malabaricus*, indicando que estas espécies apresentam mecanismos distintos de resposta aos agentes neurotóxicos presentes no reservatório e, ainda, que as tilápias apresentam uma resposta aparentemente mais eficiente de controle da homeostase, uma vez que o aumento da GSH neste grupo demonstra uma indução de resposta de neutralização de possíveis agentes oxidantes produzidos no cérebro, assim como o aumento da AChE neste mesmo grupo pode demonstrar uma resposta compensatória aos efeitos redutores da atividade desta enzima (resposta ineficiente nas traíras do Iraí, as quais apresentaram níveis mais baixos de atividade da AChE) .

Além dos efeitos encontrados no cérebro dos animais avaliados, a presença de inibidores da atividade colinesterásica no reservatório fica evidente na análise da AChE muscular, onde os três grupos avaliados no Iraí apresentaram uma redução da atividade enzimática. A inibição da acetilcolinesterase tem sido particularmente bem documentada como biomarcador neurotóxico específico de exposição a pesticidas organofosforados, carbamatos, metais pesados e detergentes (PESSOA *et al.*, 2011, BARBIERI e FERREIRA, 2011, RODRIGUES *et al.* 2011), além de já ter sido descrita em diversos trabalhos com peixes expostos em ambientes eutrofizados (MARIOTTINI *et al.*, 2003, DE LA TORRE, SALIBIAN E FERRARI, 2007, 2002), assim como em exposição aguda a frações solúveis de óleo cru (AKAISHI *et al.*,



2004), a chumbo(II) (RABITTO *et al.*, 2005) e a misturas de herbicidas (ROSSI *et al.*, 2011). Por outro lado, Romani *et al.* (2003) encontrou um aumento da atividade específica da AChE em espécimes de *Sparus auratus* expostos à concentrações subletais de cobre, e Kist *et al.* (2012) mostrou também um aumento na atividade da AChE cerebral em peixes zebra em decorrência da ação de microcistinas, uma família de cianotoxinas capaz de induzir danos hepatotóxicos através da inibição de fosfatases e geração de estresse oxidativo. Como o relatório disponibilizado pelo IAP ressaltou a existência de elevada densidade de cianobactérias no reservatório do Iraí, com dominância de alguns taxa com potencial tóxico como *Microcystis aeruginosa* e *Aphanizomenon spp.* (Relatório IAP, 2009b), o aumento da AChE cerebral encontrado no grupo de tilápias do Iraí pode também estar relacionado a presença de cianotoxinas no reservatório do Iraí. Além da poluição, outras variáveis como temperatura e peso do animal também podem exercer um efeito direto ou indireto sobre a atividade da AChE (CHUIKOA *et al.*, 1997), o que também poderia justificar as diferenças encontradas entre os grupos.

Como o reservatório do Iraí é reconhecidamente um reservatório impactado, é possível inferir que os resultados obtidos no presente estudo podem estar relacionados à poluição ambiental presente no reservatório e, ainda, que tanto os biomarcadores morfológicos quanto os bioquímicos utilizados neste trabalho mostraram-se sensíveis a esta poluição. Neste contexto destacam-se principalmente os biomarcadores histopatológicos, os quais podem ser identificados como um forte indício dos efeitos da poluição do reservatório, uma vez que estes biomarcadores representam um grau mais avançado de alteração celular e não são tão sensíveis a fatores endógenos ou fatores externos como os parâmetros físico-químicos.

Ademais, o conjunto dos resultados descritos neste estudo mostra que as espécies avaliadas apresentam diferentes níveis de sensibilidade para cada um dos biomarcadores investigados. Entretanto, contrariamente ao esperado, não foi detectada uma espécie predominantemente sensível, mas sim espécies bioindicadoras de vias de exposição, como o caso da exposição hídrica para os lambaris e trófica para as traíras. Visto que a mistura de contaminantes presentes no reservatório do Iraí tem caráter complexo, não é possível identificar com exatidão qual mecanismo constitui a origem dos danos ou alterações encontradas, pois podem ocorrer fenômenos de sinergismo e/ou antagonismos de efeitos que são característicos de exposição a misturas de contaminantes (BOELSTERLI, 2007).

Além disto, a suscetibilidade de diferentes espécies de peixes a estes poluentes pode ser influenciada não apenas pelas características dos compostos químicos, como também pelo hábitat, tipo de alimentação, status nutricional e fisiologia de cada espécie (ELLESAT *et al.*, 2011).

A exposição crônica a poluentes pode gerar várias lesões em animais expostos, podendo até mesmo, dependendo do grau de danos, interferir na capacidade de sobrevivência e reprodução destes. Todavia, diversos estudos tem mostrado que algumas espécies possuem uma capacidade maior de resistência a ambientes contaminados devido a adaptações genéticas ou aclimação fisiológica (WIRGIN e WALDMAN, 2004). Diversos mecanismos diferentes têm sido propostos para explicar o desenvolvimento de resistência à contaminação química, incluindo maneiras de redução da absorção ou aumento da eliminação dos xenobióticos, sequestro de contaminantes dentro de organelas específicas, ligação a proteínas como a metalotioneína (que inativa o efeito tóxico), indução de P-glicoproteínas transmembranares que conferem resistência multixenobiótica às células, ou ainda a sub-indução de receptores e vias metabólicas alvos de contaminantes como, por exemplo, a CYP1A, uma enzima metabolizadora de xenobióticos que está envolvida na ativação de hidrocarbonetos aromáticos (BRAMMELL *et al.*, 2012, WIRGIN e WALDMAN, 2004; BARD, WOODIN e STEGEMAN, 2002).

Em longo prazo, os efeitos dos poluentes e as diferenças de sensibilidade podem atingir níveis maiores, interferindo até mesmo nas relações ecológicas e composição das comunidades e ecossistemas afetados. Em ambientes poluídos, em geral são favorecidas espécies oportunistas, de pequeno porte e curta expectativa de vida, tal como *A. altiparanae* e *A. fasciatus*, espécies onívoras tolerantes que têm sido associadas a diferentes ambientes poluídos (ALEXANDRE, ESTEVES e MELO, 2010, CUNICO, AGOSTINHO e LATINI, 2006). Entretanto, apesar de serem relativamente comuns em ambientes impactados, os lambaris não são totalmente resistentes aos efeitos da poluição ambiental como mostram os dados obtidos no presente trabalho, no qual é possível perceber que os lambaris apresentam uma considerável sensibilidade a poluentes dispersos na coluna de água, os quais podem provocar danos severos nas brânquias que podem potencialmente comprometer a sobrevivência destes animais.

Assim como as espécies de lambaris anteriormente citadas, as tilápias também são espécies tolerantes que distribuem-se em grande parte do território nacional, podendo representar um risco às populações de peixes nativas, visto que

são espécies introduzidas oportunistas, conhecidas por impactar a estrutura de comunidades nativas ao competir por recursos e predação ovos de peixes de níveis tróficos mais altos (MARTIN, VALENTINE e VALENTINE, 2010). Neste contexto, justifica-se uma discussão sobre o potencial das tilápias do reservatório do Iraí de impactar a estrutura de populações endêmicas de lambaris do reservatório, as quais apresentam sensibilidade eminente à exposição hídrica a xenobióticos presentes no reservatório e similaridade de posição trófica em relação às tilápias. No entanto, aparentemente as tilápias do reservatório não exercem competição excludente com os lambaris, pois mesmo diante das características anteriormente citadas, os lambaris ainda compõem o grupo de maior abundância no reservatório (ABILHOA *et al.*, 2008).

As traíras do reservatório do Iraí, por outro lado, aparentemente sofrem um risco potencial maior de sofrer efeitos a nível populacional, pois como foi demonstrado no presente estudo, muitas delas apresentam lesões e alterações no fígado e gônadas, as quais podem acabar incorrendo em um risco de interferência na capacidade de sobrevivência e reprodução destes animais. Isso, associado à baixa taxa de fertilidade da espécie (BARBIERI, 1989) e a potencial predação de ovos por diversos peixes, incluindo tilápias e lambaris, pode representar um risco de interferência na manutenção da espécie no reservatório. Além disto, há evidências crescentes de que a poluição, ainda que em baixos níveis, pode reduzir a fecundidade de populações de peixes, levando a um declínio ou, eventualmente, a extinção de algumas populações, principalmente nos níveis tróficos mais altos, onde geralmente as taxas de reprodução são limitadas e os animais costumam ser mais vulneráveis à poluição aquática (VAN DER OOST, BEYER, VERMEULEN, 2003). Deste modo, a diversidade de espécies em uma comunidade pode ser alterada quando espécies mais resistentes apresentam índices de fecundidade e taxa de crescimento superiores a outras espécies mais vulneráveis (WIRGIN e WALDMAN, 2004), assim como já foi demonstrado em diferentes estudos em rios impactados do Brasil, onde foram observadas mudanças na composição e abundância de espécies em comunidades animais afetadas por efluentes urbanos, com reduções na diversidade de espécies, aumento de espécies tolerantes e espécies introduzidas, além do declínio de espécies mais sensíveis (ALEXANDRE, ESTEVES e MELO, 2010, CUNICO, AGOSTINHO e LATINI, 2006, PINTO, PEIXOTO e ARAÚJO, 2006).

Finalmente, o conhecimento sobre as variações de sensibilidade em diferentes espécies é importante não apenas no estudo e manejo de comunidades expostas em ambientes poluídos, mas também na avaliação de riscos de contaminação e escolha de bioindicadores, uma vez que a escolha de espécies mais resistentes como indicadores da condição ambiental pode incorrer em erros de interpretação, com subestimativas dos efeitos da poluição sobre as comunidades destes ecossistemas. Vale ainda ressaltar que, assim como mostraram os dados obtidos no presente trabalho, é de grande importância a análise múltipla de biomarcadores na avaliação de efeitos de misturas complexas de contaminantes, pois cada biomarcador pode ser mais ou menos sensível dependendo da espécie em que é avaliado e da via principal de exposição.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados neste trabalho indicam que os animais residentes no reservatório do Iraí estão sofrendo efeitos da poluição aquática. O grupo *Astyanax sp.* foi o mais sensível na avaliação das brânquias, enquanto o grupo *H. malabaricus* foi o mais sensível na avaliação histopatológica do fígado e o grupo *T. rendalli* foi o mais sensível na avaliação das gônadas. Deste modo, o presente estudo mostrou que a sensibilidade à poluição aquática em peixes varia não somente em relação a espécie, mas também em relação ao órgão analisado, uma vez que uma mesma espécie pode apresentar níveis distintos de resposta em cada órgão.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados mostrados neste trabalho, fica evidente a importância da utilização do biomonitoramento como ferramenta de avaliação da qualidade da água em reservatórios de abastecimento público. Somente através desta abordagem é possível observar os reais efeitos das misturas complexas de xenobióticos que podem estar presentes nestes ambientes, como mostra o primeiro capítulo deste trabalho, através do qual é possível perceber que ainda que um reservatório de abastecimento público seja avaliado como moderadamente degradado, ele pode conter um conjunto de substâncias com potencial tão tóxico quanto um reservatório severamente impactado e considerado fora dos padrões adequados para utilização em abastecimento doméstico.

Contudo, assim como também foi mostrado no segundo capítulo deste trabalho, a escolha dos bioindicadores utilizados no biomonitoramento deve ser planejada de modo cuidadoso, levando-se em conta fatores ligados à fisiologia e o comportamento de cada espécie. Os lambaris e as traíras, por exemplo, são espécies nativas largamente distribuídas no território nacional, sendo muito comuns em diversos reservatórios, o que faz destas espécies bioindicadores muito úteis em programas de monitoramento e manejo destes ambientes. No entanto, cada uma destas espécies apresenta características particulares que podem ser mais ou menos adequadas aos objetivos do estudo. Os lambaris possuem uma boa capacidade de adaptação ecofisiológica e de utilização de habitats, sendo consideradas por muitos autores como espécies tolerantes que podem resistir em diversos ambientes. Porém, no presente estudo, estes animais mostraram-se particularmente sensíveis a efeitos nas brânquias, sendo portanto mais adequadas em estudos de exposição a xenobióticos por via hídrica. As traíras, por outro lado, podem ser bastante úteis em estudos de avaliação da permanência de poluentes e potencial de biomagnificação ao longo das cadeias tróficas, pois ao ocupar um nível trófico mais elevado, elas podem concentrar naturalmente uma maior quantidade e diversidade de poluentes. Por sua vez, as tilápias, que apresentaram uma sensibilidade intermediária em diferentes biomarcadores, poderiam ser utilizadas tanto em exposições hídricas quanto tróficas e, além disto, aparentemente apresentam uma sensibilidade maior a efeitos tóxico-reprodutivos, sendo indicadas, desta forma, como bons bioindicadores em estudos com desreguladores endócrinos.

Além de variações interespecíficas, a variação natural de respostas biomarcadoras também pode ser um empecilho na análise dos efeitos da contaminação ambiental, pois de modo geral os biomarcadores estão sujeitos a variações interindividuais que podem mascarar resultados e confundir a interpretação destes, principalmente em análises de níveis mais básicos como proteômica ou genômica. Neste contexto, exposições *in situ* como a que foi realizada na primeira etapa deste estudo são bastante úteis por permitir uma padronização de condições, minimizando deste modo o número de variáveis secundárias que podem influenciar os resultados.

Finalmente, dada a complexidade de elementos envolvidos em sistemas aquáticos, ressalta-se a importância da utilização de abordagens integradas de avaliação ambiental, que envolvam tanto o levantamento dos padrões físico-químicos do ambiente quanto os efeitos sobre a biota local, fazendo com que estratégias de monitoramento mais completas possibilitem programas de controle ambiental mais eficientes.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-MONEIM AM, AL-KAHTANI MA, ELMENSHAWY OM. Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments, Saudi Arabia. *Chemosphere*. Aug;88(8):1028-35. 2012

ABILHOA, V. ; FONTINO, V.C. ; AZEVEDO FILHO, D.P. ; SÁ, P. Z. ; SILVA, P.A. ; BASTOS, L.P. . Composição e estrutura da ictiofauna do reservatório do Iraí, Região Metropolitana de Curitiba, Paraná, Brasil.. In: Anais do IV Seminário do Projeto Interdisciplinar de Pesquisa em Eutrofização de Águas de Abastecimento Público, 2003, Curitiba. UFPR Imprensa Universitária, v. único. p. 70-74. 2003

ADAMS, M. Biological Indicators of aquatic Ecosystem Stress. *American Fisheries Society*, 2002.

AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.*, v.105, p.121-126, 1984.

AGIUS, C.; ROBERTS, R.J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Disease*. Sep;26(9):499-509, 2003

AKAISHI, F.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; JAKOBI, S.C.G.; EIRAS-STOFELLA, D.R.; ST-JEAN, S.D.; COURTENAY, S.C.; LIMA, E.F.; WAGENER, A.L.R.; SCOFIELD, A.L.; OLIVEIRA RIBEIRO C.A. Morphological and Neurotoxicological Findings in Tropical Freshwater Fish (*Astyanax* sp.) After Waterborne and Acute Exposure to Water Soluble Fraction (WSF) of Crude Oil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 244–253, 2004

ALMROTHA, B.C.; STURVEA, J.; EIRÍKUR STEPHENSEN, E.; TOR FREDRIK HOLTHC, T.F.; FÖRLINA, L.; Protein carbonyls and antioxidant defenses in corks wrasse (*Symphodus melops*) from a heavy metal polluted and a PAH polluted site. *Marine Environmental Research*. Volume 66, Issue 2, August 2008, Pages 271–277

ANDREOLI, C. V; CARNEIRO, C. IV Seminário do Projeto Interdisciplinar de pesquisa em Eutrofização de águas de abastecimento público – Tema: Eutrofização, Curitiba, 143p.; 2003.

ATLAS BRASIL : Abastecimento Urbano de Água : Panorama Nacional / Agência Nacional de Águas; Engecorps/ Cobrape – Brasília : ANA : Engecorps/ Cobrape, 2010. Disponível em: <<http://atlas.ana.gov.br/Atlas/forms/Download.aspx>> Acesso em: 25/03/2011 – 23:00 horas.

ATLI, G., CANLI, M.; Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Volume 73, Issue 8, November, Pages 1884–1889, 2010

ATLI, G.; CANLI, M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 145 282–287, 2007



AYAS Z, EKMEKCI G, OZMEN M, YERLI SV. Histopathological changes in the livers and kidneys of fish in Sariyar Reservoir, Turkey. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 23 : 242–249, 2007

BAENSCH, H.A. AND RIEHLR. Aquarien atlas. Band 2. Mergus, Verlag für Natur- und Heimtierkunde GmbH, Melle, Germany. 1216 p. 1985.

BARBIERI, G. Dinâmica da reprodução e crescimento de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Osteichthyes, Erythrinidae) da Represa do Monjolinho, São Carlos/SP. *Rev. Bras. Zool.* [online]. vol.6, n.2, pp. 225-233, 1989

BARBIERI E, FERREIRA LAA. Effects of the organophosphate pesticide Folidol 600® on the freshwater fish, Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99(3):209-214, 2011

BARD SM, WOODIN BR, STEGEMAN JJ. Expression of P-glycoprotein and cytochrome p450 1A in intertidal fish (*Anoplarchus purpureus*) exposed to environmental contaminants. *Aquat Toxicol.* Oct 2;60(1-2):17-32. 2002

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W. et al. *Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution.* J. Fish Dis., v.22, p.25-34, 1999.

BOELSTERLI, U.R.S. A. Mechanistic Toxicology. The molecular basis of how chemicals disrupt biological targets, 2nd Edition. Taylor-Francis, London. 2003

BIAGINI, F.R.; DAVID, J.A.O.; FONTANETTI, C.S.; The use of histological, histochemical and ultramorphological techniques to detect gill alterations in *Oreochromis niloticus* reared in treated polluted. *Waters. Micron* 40:839–844, 2009

BOSCOLO, W. R.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M.; FURUYA, W. M.; & MEURER, F. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases inicial e de crescimento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30(5), 1391-1396, 2001

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem*, v.72, p.248-254, 1976.

BRAMMELL, B.F., PRICE, D.J.; BIRGE, W.J.; ELSKUS, A.A. Lack of CYP1A responsiveness in species inhabiting chronically contaminated habitats: Two varieties of resistance?, *Comp. Biochem. Physiol., C* (2012), doi:[10.1016/j.cbpc.2012.07.001](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.07.001)

BRETAUD, S.; TOUTANT J.; SAGLIO P. Effects of Carbofuran, Diuron, and Nicosulfuron on Acetylcholinesterase Activity in Goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* .v. 47, p. 117-124, 2000.

BRITO IA, ARRUDA FREIRE C, YAMAMOTO FY, SILVA DE ASSIS HC, RODRIGUES SOUZA-BASTOS L, CESTARI MM, DE CASTILHOS GHISI N, PRODOCIMO V, FILIPAK NETO F, DE OLIVEIRA RIBEIRO CA. Monitoring water quality in reservoirs for human supply through multi-biomarker evaluation in tropical fish. *J. Environ. Monit*, 14, 615., 2012

BRITSKI, H.A. Peixes de água doce do Estado de São Paulo: Sistemática. In: Poluição e Piscicultura. Faculdade de Saúde Pública da USP, Instituto de Pesca da C.P.R.N. da Secretaria da Agricultura, São Paulo, p.79-108. 1972.

CAMARA, E.M.; CARAMASCHI, E.P.; PETRY, A.C. Fator de condição: Bases Conceituais, Aplicações e Perspectivas de Uso em Pesquisas Ecológicas com Peixes. *Oecologia Australis*, 15(2): 249-274, Junho 2011

CAMARGO, M.M. P.; MARTINEZ, C.B. R..Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream.*Neotrop.ichthyol.* [online]., vol.5, n.3, pp. 327-336. 2007

CARVALHO, L.N. FERNANDES, C.H.V. MOREIRA, V.S.S. Alimentação de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Osteichthyes, Erythrinidae) no rio Vermelho, Pantanal Sul Mato-Grossense. *Rev. bras. Zoociências* Juiz de Fora. V. 4 Nº2 p. 227-236; Dez/2002

CASTRO, R.M.C. AND L. CASATTI, The fish fauna from a small forest stream of the Upper Parana River Basin, southern Brazil. *Ichthyol.Explor.Freshwat.* 7(3/4):337-352, 1997.

CAVALHEIRO DE MENEZES, C.; LORO, V.L.; MILENE BRAGA DA FONSECA, M.B.; CATTANEO, R.; PRETTO, A.; MIRON, D.S.; ADRIANA SANTI, A.; Oxidative parameters of *Rhamdia quelen* in response to commercial herbicide containing clomazone and recovery pattern. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. Volume 100, Issue 2, Pages 145–150, June 2011

CHANDRASEKARA, L.W.H.; PATHIRATNE, A. Body size-related differences in the inhibition of brain acetylcholinesterase activity in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by chlorpyrifos and carbosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.67, p.109-119, 2007.

CHEN, G., XU, Y., XU, L., ZHENG, Y., SCHRAMM, K.W., KETTRUP, A. *Influence of dioxin and metal-contaminated sediment on phase I and II biotransformation enzymes in silver crucian carp. Ecotoxicol Environ Saf.* Jul;40(3):234-8. 1998

CLEMENTE, Z.; BUSATO, R. H.; RIBEIRO, C. A. O.; CESTARI, M. M.; RAMSDORF, W. A.; MAGALHAES, V. F.; WOSIACK, A. C.; SILVA DE ASSIS H. C. Analyses of paralytic shellfish toxins and biomarkers in a southern Brazilian reservoir . *Toxicon* 55:396–406, 2010

COIMBRA, AM, FIGUEIREDO-FERNANDES, A, REIS-HENRIQUES, MA. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), liver morphology, CYP1A activity and thyroid hormones after endosulfan dietary exposure. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 89(3); 230-236. 2007

COSTA, P.M., CAEIRO, S., LOBO, J., MARTINS, M., FERREIRA, A.M., CAETANO, M., VALE, C., DELVALLS, T.A., COSTA, M.H., Estuarine ecological risk based on hepatic histopathological indices from laboratory and in situ tested fish. *Marine Pollution Bulletin* 62, 55–65. 2011

CUNICO, A.M.; AGOSTINHO, A.A.; LATINI, J.D. Influência da urbanização sobre as assembléias de peixes em três córregos de Maringá, Paraná. *Rev. Bras. Zool.* [online]., vol.23, n.4, pp. 1101-1110. 2006

DEFOREST, D.K.; BRIX, K.V.; ADAMS, W.J. Assessing metal bio-accumulation in aquatic environments: the inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. *Aquatic Toxicology* 84 (2), 236–246. 2007

DE LA TORRE, F.R.; FERRARIA, L.; SALIBIAN, A. Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 131 (271–280), 2002.

DE LA TORRE, F.R.; SALIBIAN, A.; FERRARI, L.; Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish. *Chemosphere* 68:582–1590, 2007

ELLESAT, K.S.; YAZDANI, M.; HOLTH, T.F.; HYLLAND, K. Species-dependent sensitivity to contaminants: An approach using primary hepatocyte cultures with three marine fish species. *Marine Environmental Research* 72,216:224, 2011

ELLMAN, G.L.; COURTNEY D.; ANDRES JR., V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*.v.7, p. 88-96, 1961.

EL-SAYED, A.M. *Tilapia culture*. Edited by CABI Publishing, Cambridge, USA. 2006.

FEIST, S. W.; LONGSHAW, M. Histopathology of fish parasite infections – importance for populations. *Journal of Fish Biology* 73, 2143–2160, 2008.

FERNANDES, A.F.; CARDOSO, J.V.F.; SANTOS, S.G.; MONTEIRO, S.M.; CARROLA, J.; MATOS, P.; FERNANDES, A.F. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. *Pesq. Vet. Bras.* 27(3):103-109, março 2007

FERREIRA M.; MORADAS-FERREIRA P.; REIS-HENRIQUESA, M.A. Oxidative stress biomarkers in two resident species, mullet (*Mugil cephalus*) and flounder (*Platichthys flesus*), from a polluted site in River Douro Estuary, Portugal. *Aquatic Toxicology* 71 (2005) 39–48

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA L.S.; Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil* .; 43(1): 61-8, 1997

FILIPAK NETO, F.; ZANATA, S.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; BUSSOLARO, D.; FERRARO, M.V.M.; RANDI, M.A.F.; ALVES COSTA, J R.M.; CESTARI, M.M.; ROCHE, H.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Use of hepatocytes from *Hoplias malabaricus* to characterize the toxicity of a complex mixture of lipophilic halogenated compounds. *Toxicol. In Vitro*, v.21, p.706-715, 2007.

FLAMMARION, P.; NOURY, P.; GARRIC, J. The measurement of cholinesterase activities as a biomarker in chub (*Leuciscus cephalus*): the fish length should not be ignored. *Environmental Pollution* 120:325–330, 2002.

FRANCO, J.L.; TREVISAN, R.; POSSER, T.; TRIVELLA, D.B.B.; HOPPE, R. ROSA, J.M.; DINSLAKEN, D.F.; DECKER, H.; TASCA, C.I.; LEAL, R.B.; MARQUES, M.R.F.; BAINY, A.C.D. DAFRE, A.L. Biochemical alterations in caged Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73:864–872, 2010.

FROESE, R. Cube law, condition factor and weight–length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *J. Appl. Ichthyol.* 22: 241–253, 2006

FROESE, R. e D. PAULY. Editors. FishBase. World Wide Web electronic publication. (www.fishbase.org), version 2011.

GARAVELLO, J.C.; SAMPAIO, F.A.A. Five new species of genus *Astyanax* Baird & Girard, 1854 from Rio Iguaçu, Paraná, Brazil (Ostariophysi, Characiformes, Characidae). *Braz. J. Biol.*, vol. 70, no. 3, p. 847-865, 2010

GENTEN, F.; TERWINGHE, E.; DANGUY, A. Atlas of fish histology. Published by Science Publishers, Enfield, NH, USA, 2009

GIULIANI R, BETTONI F, LEALI D, MORANDINI F, APOSTOLI P, GRIGOLATO P, CESANA BM, ALEO MF. Focal adhesion molecules as potential target of lead toxicity in NRK-52E cell line. *FEBS Letters* 579:6251–6258, 2005

GUIMARAES, A.T.B., H.C. SILVA DE ASSIS AND W. BOEGER. The effect of trichlorfon on acetylcholinesterase activity and histopathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 68: 57–62, 2007

GÜL S, BELGE-KURUTAŞ E, YILDIZ E, SAHAN A, DORAN F. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. *Environment International* 30:605– 609, 2004

IAP. (a) Monitoramento da qualidade de água dos rios da Bacia do Alto Iguaçu, na região metropolitana de Curitiba, no período de 2005 a 2009. Instituto Ambiental do Paraná; Curitiba, 2009. p114.

IAP. (b) Monitoramento da qualidade de água dos reservatórios do estado do Paraná no período de 2005 a 2009. Instituto Ambiental do Paraná; Curitiba, 2009. p120.

JIANG, Z-Y.; HUNT, J.V.; WOLFF, S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical Biochemistry*, v.202, p.384-389, 1992.

JIANG, Z-Y.; WOOLLARD, A.C.S.; WOLFF, S.P. Lipid hydroperoxides measurement by oxidation of  $\text{Fe}^{2+}$  in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids*, v.26, p.853-856, 1991.

JOHNSON, L.L., CASILLAS, E., SOL, S., COLLIER, T., STEIN, J., VARANASI, U. Contaminant effects on reproductive success in selected benthic fish. *Mar. Environ. Res.* v.35. p.165–170. 1993.

KAOD, H.A. e EL-DAHSHAN A.R. Bioaccumulation and histopathological alterations of the heavy metals in *Oreochromis niloticus* fish. *Nature and Science* 8(4), 147-156, 2010;

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for several activities of the glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.*, v.251, p.6183–6188, 1976.

KRAUGERUD M, DOUGHTY RW, LYCHE JL, BERG V, TREMOEN NH, ALESTRØM P, ALEKSANDERSEN M, ROPSTAD E. Natural mixtures of persistent organic pollutants (POPs) suppress ovarian follicle development, liver vitellogenin immunostaining and hepatocyte proliferation in female zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 116– 117:16– 23, 2012

LEVINE, R.L.; WILLIAMS, J.A.; STADTMAN, E.P.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.*, v.233, p.346–357, 1994.

LINDE-ARIAS, AR. INÁCIO, AF. ALBURQUERQUE, C. FREIRE, MM. MOREIRA, JC. Biomarkers in an invasive fish species, *Oreochromis niloticus*, to assess the effects of pollution in a highly degraded Brazilian River. *Science of the Total Environment*. 399:186–192, 2008

LIU, C., YU, K., SHI, X., WANG, J., LAM, P., WU, R., ZHOU, B. *Induction of oxidative stress and apoptosis by PFOS and PFOA in primary cultured hepatocytes of freshwater tilapia (Oreochromis niloticus)*. *Aquatic Toxicology* 82 (2): 135-43. 2007

LOUIZ, I., BEN-ATTIA, M.; BEN-HASSINE, O.K. Gonadosomatic index and gonad histopathology of *Gobius niger* (Gobiidae, Teleost) from Bizerta lagoon (Tunisia): Evidence of reproduction disturbance. *Fisheries Research* 100:266–273, 2009

MARTIN CW, VALENTINE MM, VALENTINE JF. Competitive Interactions between Invasive Nile Tilapia and Native Fish: The Potential for Altered Trophic Exchange and Modification of Food Webs. *PLoS ONE* 5(12): e14395. 2010

MAZON, F. CERQUEIRA, C. C. C. FERNANDES, M. N. Gill Cellular Changes Induced by Copper Exposure in the South American Tropical Freshwater Fish *Prochilodus scrofa*. *Environmental Research Section A* 88:52-63, 2002

MENEZES, C.C.; LORO, V.L.; FONSECA, M.B.; CATTANEO, R.; PRETTO, A.; MIRON, D.S.; SANTI, A. Oxidative parameters of *Rhamdia quelen* in response to commercial herbicide containing clomazone and recovery pattern. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 100:145–150, 2011

MIRANDA, A.L.; ROCHE, H.; RANDI, M.A.F.; MENEZES, M.L.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Bioaccumulation of chlorinated pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish *Hoplias malabaricus*: Histopathological, physiological, and immunological findings. *Environment International* Volume 34, Issue 7, Pages 939–949, October, 2008

MLAMBO, S.S.; VUREN, J.H.J, BARNHOORN, I.E.J.; BORNMAN, M.S. Histopathological changes in the reproductive system (ovaries and testes) of

*Oreochromis mossambicus* following exposure to DDT. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28:133–139, 2009

MONCAUT, N.; LO NOSTRO, F.; MAGGESE, M.C.. Vitellogenin detection in surface mucus of the South American cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) induced by estradiol-17 $\beta$ . Effects on liver and gonads. *Aquatic Toxicology* 63, 127:137, 2003

MUMFORD, S., HEIDEL, J., SMITH, C., MORRISON, J., MACCONNELL, B. AND BLAZER, B. Fish histology and histopathology, U.S Fish and Wildlife Services (USFWS). National Conservation Training Center (NCTC). 2007.

NOGUEIRA, P.; PACHECO, M.; PEREIRA, M.L.; MENDO, S.; ROTCHELL, J.M. Anchoring novel molecular biomarker responses to traditional responses in fish exposed to environmental contamination. *Environmental Pollution* 158:1783–1790, 2010

O'HALLORAM, K.; AHOKAS, J.T.; e WRIGHT, P.F.A.; The adverse effects of aquatic contaminants on fish immune responses. *Australasian journal of Ecotoxicology*. Vol4, pp. 9-28, 1998

OLIVEIRA, E.C.; SANTOS, L.E.S.; FÁVARO, L.F.; ABILHOA, V. Caracterização da assembleia de peixes em um reservatório recém-formado no Sul do Brasil. *Estudos de Biologia*, v. 30, p. 125-132, 2008.

OLIVEIRA, M.M.; SILVA FILHO, M.V.; CUNHA BASTOS, V.L.F.; FERNANDES, F.C.; CUNHA BASTOS, J.; Brain acetylcholinesterase as a marine pesticide biomarker using Brazilian fishes. *Marine Environmental Research* 63:303–312, 2007

OLIVEIRA RIBEIRO, CA, MESMER-DUDONS, P, GONZALEZ, P, YANNICK, D, BOURDINEAUD, J, BOUDOU, A, MASSABUAU, JC. Chronic and Trophic Effects of Methylmercury on Zebrafish Muscle Fibers. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 25, p. 304-305, 2008.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A ; VOLLAIRE, Y. ; SANCHEZ-CHARDI, A. ; ROCHE, H. Bioaccumulation and the Effects of Organochlorine Pesticides, PAHs and Heavy Metals in Ells (*Anguilla anguilla*) from the Camargue Biosphere Reserve. *Aquatic Toxicology*, Holanda, v. 74, p. 56-69, 2005.

PANDEY, S. PARVEZ, S. ANSARI, R.A. ALI, M. KAUR, M. HAYAT, F. AHMAD, F. RAISUDDIN, S. Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. *Chemico-Biological Interactions* 174:183–192, 2008

PARVEZA, S.; RAISUDDIN, S. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environmental Toxicology and Pharmacology*. Volume 20, Issue 1, July, Pages 112–117, 2005

PAWERT, M. MULLER, E. TRIEBSKOR N, R. Ultrastructural changes in fish gills as biomarker to assess small stream pollution . *Tissue & Cell*, 30 (6) 617-626. 1998.

PEIXOTO, F.; ALVES-FERNANDES, D.; SANTOS, D.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 85:91–96, 2006

PEYRE L, ZUCCHINI-PASCAL N, DE SOUSA G, RAHMANI R. Effects of endosulfan on hepatoma cell adhesion: Epithelial–mesenchymal transition and anoikis resistance. *Toxicology* 300:19– 30, 2012

PIETERSE, G.M. Histopathological changes in the testis of oreochromis mossambicus (Cichlidae) as a biomarker of heavy metal pollution. PhD Thesis. The Rand Afrikaans University, 2004

POPMA, T.; MASSER, M.; Tilapia Life History and Biology. Southern Regional Aquaculture Center – SRAC, Publication No. 283, March 1999

PRADO, C. P. A.; GOMIERO, L. M. and FROEHLICH, O. Spawning and parental care in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae) in the Southern Pantanal, Brazil. *Braz. J. Biol.* [online]., vol.66, n.2b, pp. 697-702. ISSN 1519-6984. 2006

PRADO, P.S.; SOUZA, C.C.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E. Reproductive disruption in lambari *Astyanax fasciatus* from a Southeastern Brazilian reservoir. *Ecotoxicol Environ Saf.* Oct;74(7):1879-87, 2011.

PRIETO, A.I.; JOS, A.; PICHARDO, S.; MORENO, I.; CAME, A.M.; Differential oxidative stress responses to microcystins LR and RR in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.) *Aquatic Toxicology* 77:314–321, 2006

PRIOLI, S.M.A.P.; PRIOLI, A.J.; JÚLIO H.F.JR.; PAVANELLI, C.S.; OLIVEIRA, A.V.; CARRER, H.; CARRARO, D.M.; PRIOLI, L.M. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genet. Mol. Biol.* [online]. vol.25, n.4, pp. 421-430. 2002

QUINLAN, G.J.; GUTTERIDGE, J.M.C. Carbonyl assay for oxidative damage to proteins. In: TANIGUCHI, N.; GUTTERIDGE, J.M.C. (Eds), *Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species*. Oxford University, New York, p.257-258, 2000.

RABITTO, I.S. ALVES COSTA, J.R.M. SILVA DE ASSIS, H.C. PELLETIER, E. AKAISHI, F.M. ANJOS, A. RANDI, M.A.F. OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60:147–156, 2005

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. (Editors). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America (CLOFFSCA). Jr. Published by Edipucrs, Porto Alegre, Brazil 2003

RIEDE, K. Global register of migratory species - from global to regional scales. Final Report of the R&D-Projekt 808 05 081. Federal Agency for Nature Conservation, Bonn, Germany. 329 p., 2004

RODRIGUES S.R., CALDEIRA C., CASTRO B.B., GONÇALVES F., NUNES B., ANTUNES S.C. Cholinesterase (ChE) inhibition in pumpkinseed (*Lepomis gibbosus*) as environmental biomarker: ChE characterization and potential neurotoxic effects of xenobiotics. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 99, 181-188. 2011

ROMEO, M.; BENNANI, N.; GNASSIA-BARELLI, M.; LAFAURIE, M.; GIRARD J.P. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquatic Toxicology*. Volume 48, Issues 2–3, March 2000, Pages 185–194

ROSSI, S.C.; SILVA, M.D.; PIANCINI, L.D.S; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; CESTARI, M.M.; SILVA DE ASSIS, H.C. Sublethal Effects of Waterborne Herbicides in Tropical Freshwater Fish. *Bull Environ Contam Toxicol*. 87:603–607, 2011

ROSSTEUSCHER, S., SCHMIDT-POSTHAUS, H., SCHÄIERS, C., TEIGELER, M., SEGNER, H., Background pathology of the ovary in a laboratory population of zebrafish (*Danio rerio*). *Dis. Aquat. Org.* 79, 169–172.. 2008.

SANTOS, D.C.M.; MATTA, S.L.P.; OLIVEIRA, J.A., SANTOS, J.A.D.; Histological alterations in gills of *Astyanax aff. bimaculatus* caused by acute exposition to zinc. *Exp. Toxicol. Pathol.* Nov;64(7-8):861-6. 2011

SEDLAK J, LINDSAY RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*. Oct 24;25(1):192-205. 1968

SEEGERS, L. The fishes of the Lake Rukwa drainage. *Ann. Mus. R. Afr. Centr., Sci. Zool.*, 278:1-407, 1996.

SCHULZ, U. H. e MARTINS-JUNIOR, H.. *Astyanax fasciatus* as bioindicator of water pollution of Rio dos Sinos, RS, Brazil. *Braz. J. Biol.* [online]., vol.61, n.4, pp. 615-622. 2001

SHAILAJA, M.S., SILVA C. Evaluation of impact of PAH on a tropical fish, *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. *Chemosphere* 53: 835–841, 2003

SHIOGIRI NS, PAULINO MG, CARRASCHI SP, BARALDI FG, DA CRUZ C, FERNANDES MN. Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. *Environ Toxicol Pharmacol*. Sep;34(2):388-96. 2012

SILVA, J.P.A., MUELBERT, A.E., OLIVEIRA, E.C., FÁVARO, L.F. Reproductive tactics used by the Lambari *Astyanax aff. fasciatus* in three water supply reservoirs in the same geographic region of the upper Iguaçu River. *Neotropical Ichthyology*, 8(4):885-892, 2010

SMART, R. C.; HODGSON, E. Molecular and biochemical toxicology . 4th ed. Published by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2008.



SURESH, N. Effect of cadmium chloride on liver, spleen and kidney melano macrophage centres in *Tilapia mossambica* *Journal of Environmental Biology* July 2009, 30 (4) 505-508, 2009

THOPHON S, KRUATRACHUE M, UPATHAM ES, POKETHITIYOOK P, SAHAPHONG S, JAR-ITKHUAN S. Histopathological alterations of white seabass. *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environ Pollut* 121:307–20, 2003

VALAVANIDIS, A., VLAHOIANNI, T., DASSENAKIS, M., SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64 (2006) 178–189

VANCINI, R. L.; LIRA, C. A. B.; ABOULAFIA, B.; NOUAILHETAS, V. L. A. Radical livre, estresse oxidativo e exercício. 2005. Citação e referências a documentos eletrônicos. Disponível em <[www.centrodeestudos.org.br/pdfs/oxidativo.pdf](http://www.centrodeestudos.org.br/pdfs/oxidativo.pdf)> Acesso em: Março/2011

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 13, p. 57-149. 2003.

VAN DYK JC, COCHRANE MJ, WAGENAAR GM Liver histopathology of the sharptooth catfish *Clarias gariepinus* as a biomarker of aquatic pollution. *Chemosphere* 87:301–311, 2012

VENKATESWARA RAO, J., D. SHIPANJALI, P. KAVITHA AND S.S. MADHAVENDRA: Toxic effects of profenofos on tissue acetylcholinesterase and gill morphology in a euryhaline fish *Oreochromis mossambicus*. *Arch. Toxicol.*, 77 (4), 227-232, 2003

VIEIRA, L.R., SOUSA, A., FRASCO, M.F., LIMA, I., MORGADO, F., GUILHERMINO, L. Acute effects of benzo[a]pyrene, anthracene and a fuel oil on biomarkers of the common goby. *Sci Total Environ.* Jun 1;395(2-3):87-100, 2008

WELCOMME, R.L., International introductions of inland aquatic species. FAO Fish. Tech. Pap. 294. 318 p. 1988.

WESTER, P.W., VAN DER VEN, L.T.M., VETHAAK, A.D., GRINWIS, G.C.M., VOS, J.G., Aquatic toxicology: opportunities for enhancement through histopathology. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 11, 289–295. 2002.

WIRGIN I, WALDMAN JR. Review: *Resistance to contaminants in North American fish populations*. *Mutation Res.* 552:73–100. 2004

WOLF, J. C.; WOLFE, M. J..A Brief Overview of Nonneoplastic Hepatic Toxicity in Fish. *Toxicologic Pathology*, 33:75–85, 2005

WOLKE, R.E. Piscine macrophages aggregates: a review. *Annu Rev Fish Dis*, 2: 91–108, 1992

WONG, C.K.C.; WONG, M.H. Morphological and biochemical changes in the gills of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure. *Aquatic Toxicology* 48:517–527, 2000

XAVIER, C.F. Avaliação da influência do uso e ocupação do solo e das características geomorfológicas sobre a qualidade das águas de dois reservatórios da Região Metropolitana de Curitiba – Paraná. Dissertação (mestrado), Universidade Federal do Paraná, Paraná, Brasil. 2005

XU W.; LI, Y.; WU, Q.; WANG, S.; ZHENG, H.; LIU, W.; Effects of phenanthrene on hepatic enzymatic activities in tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂). *Journal of Environmental Sciences*, 21(6) 854–857, 2009

YAMAMOTO, F.Y. Efeitos do 17 $\alpha$  - Etinilestradiol em *Geophagus brasiliensis* e Expressão da Vitelogenina como um Biomarcador de Desregulação Endócrina em Peixes. Dissertação (mestrado), Universidade Federal do Paraná, Paraná, Brasil. 2012

ZANATA, A.M. e CAMELIER, P. *Astyanax vermillion* and *Astyanax burgeri*: new characid fishes (Ostariophysi: Characiformes) from Northeastern Bahia, Brazil. *Neotrop. ichthyol.* [online]. 2009, vol.7, n.2, pp. 175-184. ISSN 1679-6225.